МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Учреждение образования
«Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины»

Г. Г. Гончаренко

ОСНОВЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Методическое пособие

Гомель

2003

УДК 575+663.1 (075.8)
ББК 28.041.12+30.16я73
Г 657

Рецензенты:
Чл.-корр. РАН, проф. ***Л. И. Корочкин (ИБГ РАН, Москва)***
Чл.-корр. НАН Б, проф. *А.В.Кильчевский (БГСХА, Горки)*
Кафедра биотехнологии и экологии БГСХА, Горки

Рекомендовано научно-методическим советом УО «ГГУ им. Ф. Скорины»

Гончаренко Г. Г.
Г 657 Основы генетической инженерии. Методическое пособие /Отв.ред. Л.В. Хотылева.– Гомель: УО «ГГУ им. Ф.Скорины», 2003. – 118 с.

Методическое пособие по основам генетической инженерии предназначено для студентов дневной и заочной форм обучения биологического факультета. Основная цель пособия – помочь студентам углубить и закрепить теоретические знания по предмету, познакомить с современными методами генной инженерии. Данное пособие включает шесть практических занятий. Каждое занятие состоит из теоретического блока и задач по теме. В конце пособия приведены тесты для самопроверки усвоенных знаний и подробный глоссарий современных генетических терминов.

Адресовано студентам и аспирантам специальности биология. Может быть использована для специальностей генетика, молекулярная биология и биотехнология.

Табл. 2. Ил. 44.

УДК 575+663.1 (075.8)
ББК 28.041.12+30.16я73

университет им. Ф. Скорины», 2003

СОДЕРЖАНИЕ

Друзьям по университету,
посвятившим свою жизнь генетике

ПРЕДИСЛОВИЕ

Предлагаемое методическое пособие к общему курсу «Введение в биотехнологию и генетическую инженерию», который преподается на четвертом курсе студентам биологического факультета, ставит своей целью облегчить студентам усвоение современного материала по этому, интенсивно развивающемуся предмету. Данное пособие предназначено как для использования во время проведения практических занятий, так и для самостоятельной подготовки студентов.

Методическое пособие включает 6 четырехчасовых занятий. В начале каждого занятия развернуто ставится цель. Занятие начинается с соответствующей теоретической части, в которой последовательно, по мере усложнения, излагается материал, включающий знакомство с методами и технологиями, использующимися для проведения современных генно-инженерных экспериментов, даются определения современных молекулярно-генетических терминов, которые способствуют усвоению данной темы. Для более глубокого усвоения материала приводятся задачи с подробными решениями. Практическая часть каждого занятия состоит из специализированных задач разного уровня сложности. Отдельным блоком даются задачи повышенной сложности. В конце занятия приводятся литературные источники, из которых студенты могут почерпнуть дополнительные сведения по изучаемой теме. В заключительную часть пособия включены разработанные тесты для самопроверки усвоенных знаний и подробный глоссарий.

При подготовке методического пособия автор использовал соответствующие издания по генной инженерии, молекулярной биологии и биотехнологии: Баев А.А. Генетическая инженерия. Москва. Знание, 1986; Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды: М.: Мир, 1987; Уотсон Дж., Туз Дж., Курц Д. Рекомбинантные ДНК. Краткий курс: Пер. с англ.- М.: Мир, 1986; Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика: Пер. с англ.: В 3 т. – М.: Мир, 1988; Льюин Б. Гены: – Пер. с англ. – М.: Мир, 1987; Картель Н.А. Биоинженерия: методы и возможности. Мн.: Ураджай, 1989; Картель Н.А. и др. Генетика. Энциклопедический словарь. Мн.: Тэхналогія, 1999; Кочергин Б.Н., Кочергина Н.А. Задачи по молекулярной биологии и генетике. Мн.: Народная асвета, 1982; Методы молекулярной генетики и генной инженерии/ Мазин А.В. и др. – Новосибирск: Наука, 1990; Соколовская Б.Х. Сто задач по генетике и молекулярной биологии. – Новосибирск: Наука, 1971; Жимулев И.Ф. Общая и молекулярная генетика: Учебное пособие. – Новосибирск: Издат. Новосиб. универ., 2002; Песецкая Л.Н., Гончаренко Г.Г. Сборник задач по генетике. Гомель: ГГУ, 2002; Рыбчин В.Н. Основы генетической

инженерии: Учебное пособие. – Мн.: Выш. шк., 1986; Щелкунов С.Н. Конструирование гибридных молекул ДНК. – Новосибирск: Наука, 1987; Modern genetic analysis/ Griffiths et al. – Freeman and company. New York. 1999; Principles of genetics/ Snustad P., Simmons M. Second edition – John Wiley & Sons. New York. 1999; An introduction to genetic analysis/ Griffiths et al. – Freeman and company. New York. 2000. Следует отметить, что литература по генетической инженерии и биотехнологии в настоящее время издается малыми тиражами и труднодоступна.

Данное учебное пособие формировалось постепенно в процессе проведения занятий по соответствующим генетическим курсам для студентов биофака ГГУ с 1999 по 2003г. Работе над пособием также способствовали благоприятные и многолетние контакты с коллегами молекулярными генетиками Беларуси и России. Существенным стимулом для издания учебного пособия послужил интерес, проявленный студентами для которых читались эти курсы. Их ответы на экзаменах, конструктивные вопросы и замечания в ходе практических занятий позволили постоянно улучшать учебный материал по такой бурно развивающейся современной дисциплине как генетическая инженерия и биотехнология.

В заключении следует сказать, что учебно-методическому пособию была дана благосклонная оценка рядом ведущих отечественных и зарубежных генетиков. В связи с этим автор считает своим приятным долгом выразить признательность Л.В. Хотылевой, Н.А. Картелю, И.Д. Волотовскому, О.Г. Давыденко и А.В. Кильчевскому (Беларусь), Н.П. Дубинину, Л.И. Корочкину (Россия), а также В.Х. Викслеру (Германия), Ю.И. Лобкову, В.Х. Рошке, М.З. Людвигу (США) и В. Наглю (Австрия) за поддержку и ряд полезных советов и предложений, направленных на улучшения данного учебно-методического пособия. Особая благодарность аспирантам гомельского университета Александру Суркову и Сергею Никоновичу, которые оказывали плодотворное содействие на многих этапах работы над учебным пособием.

Член-корр. НАН Б, профессор Г.Г. Гончаренко

ВВЕДЕНИЕ

В 40-е и особенно 50-е годы прошлого столетия в биологию пришли методы точных наук: химии, физики, математики, Стало возможным исследовать жизнь на молекулярном уровне, результатом чего стали замечательные открытия. Самое яркое из них – установление факта, что материальным носителем генетической информации в клетке является ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота). Это открытие стало основой зарождения и бурного развития в начале 50-х годов **молекулярной биологии** и **молекулярной генетики**. Успехи этих наук предопределили возникновение и развитие **генетической инженерии**. Благодаря достижениям **генетической инженерии** и биотехнологии стали успешно решаться вопросы производства продуктов питания за счет создания высокопродуктивных трансгенных штаммов, сортов растений и пород сельскохозяйственных животных, начато успешное лечение наследственных заболеваний на генном уровне, а также конструктивно разрабатываются вопросы управления генофондами популяций наиболее ценных животных и растений.

Что же такое **генетическая инженерия**? Когда и как она возникла и что из себя представляет?

Генетическая инженерия – это конструирование искусственным путем функционально активных генетических структур и наследственно измененных организмов. Другими словами, сущность генетической инженерии состоит в ***целенаправленном конструировании особых гибридных молекул вне организма*** (как принято говорить *in vitro*, "в пробирке") ***с последующим их введением в живой организм.*** При этом гибридные молекулы (рекомбинантные ДНК) становятся составной частью генетического аппарата данного организма. В результате наследственная программа организма изменяется, ему сообщаются новые генетические, а следовательно, биохимические и физиологические свойства. Таким образом, **цель генетической инженерии** – создание рекомбинантных ДНК, которые придали бы организму новые, полезные для человека свойства.

Генетическая инженерия впитала в себя достижения целого ряда биологических дисциплин. Ее корни: биохимия, генетика, цитология, эмбриология, вирусология, молекулярная биология и молекулярная генетика.

Термин "генетическая инженерия" появился в научной литературе где-то **около 1970 г.**, а генетическая инженерия как **самостоятельная дисциплина** возникла в **декабре 1972** г., когда ученые Джексон, Симонс

и Берг из Стенфордского университета (США) опубликовали работу о создании искусственным путем первой рекомбинантной (гибридной) молекулы ДНК. Эта молекула состояла из фрагментов ДНК, взятых у вируса sv-40, бактериофага λ и бактерии под названием кишечная палочка *E. coli*.

Ключевые слова и понятия

молекулярная биология **молекулярная генетика** **генетическая инженерия** **искусственные генетические структуры** **наследственно измененные организмы** **конструирование гибридных молекул**	***in vitro*, "в пробирке"** **создание рекомбинантных ДНК** **первая рекомбинантная (гибридная) молекула ДНК** **вирус sv-40** **бактериофаг λ** **кишечная палочка** ***E. coli***

Литература

1. **Баев А.А.** Генетическая инженерия. Москва. Знание. 1986. – 82 с.
2. **Сассон А.** Биотехнология: свершения и надежды: М.: Мир, 1987 – 411 с.
3. **Уотсон Дж., Туз Дж., Курц Д.** Рекомбинантные ДНК. Краткий курс: Пер. с англ.- М.: Мир, 1986.- 288 с., ил.
4. **Картель Н.А**. Биоинженерия: методы и возможности. Мн.: Ураджай, 1989.- 143 с.
5. **Льюин Б.** Гены: - Пер. с англ.- М.: Мир, 1987.- 544 с., ил.
6. **Рыбчин В.Н.** Основы генетической инженерии: Учеб. пособие для вузов.- Мн.: Выш. шк., 1986.- 186 с.: ил.
7. **Modern genetic analysis/** Griffiths et al. – Freeman and company. New York. 1999. – 675 p.
8. **Principles of genetics.** Snustad P., Simmons M. / Second edition – John Wiley & Sons. New York. 1999. – 876 p.
9. **An introduction to genetic analysis.** Griffiths et al. – Freeman and company. New York. 2000. – 730 p.

ГЛОССАРИЙ ТЕРМИНОВ ПО ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

А

Авторадиограмма — фотографический отпечаток, фиксирующий расположение фракций ДНК, полученных в результате электрофореза и гибридизовавшихся с радиоактивно меченым зондом. Получают путем наложения чувствительной к радиоактивному излучению фотопленки на нитроцеллюлозную мембрану, полученную после Саузерн-блот гибридизации (см.).

Антикодон — группа из трёх оснований, занимающая фиксированное положение в транспортной РНК (см. Транспортная РНК), которая комплементарна кодону (см.) в информационной (матричной) РНК (см. Информационная (матричная) РНК).

Б

Бактериофаг — вирус, поражающий определенный тип бактерий. Общее название вирусов, инфицирующих бактерии – фаги (бактериофаги).

Бактериофаг λ, фаг λ — умеренный бактериофаг, инфицирующий *E. coli* (см.). Его геном представляет собой линейную двунитчатую ДНК размером в 49 кб, упакованную в белковую оболочку. На каждом 5'-конце ДНК имеются одноцепочечные комплементарные участки (см. *Cos*-сайты) длиной в 12 нуклеотидов (см. Липкие концы, Космиды), что позволяет ей образовывать кольцевые структуры после попадания в клетку-хозяина. Фаг λ обладает способностью к умеренной инфекции, т. е. кроме разрушения клетки он может встраивать свою ДНК в хромосому бактериальной клетки и длительное время реплицироваться синхронно с ДНК хозяйской клетки.

Банк генов *(gene bank)* — набор генов данного организма, полученный на основе рекомбинантных ДНК (см. Геномная библиотека, Библиотека генов).

Библиотека генов *(gene library)* — коллекция произвольно клонированных фрагментов геномной ДНК организма (см. Геномная библиотека, Банк генов) или специальный набор фрагментов ДНК, представляющих, напр., коллекцию иРНК (см. РНК информационная, кДНК), экспрессирующуюся в клетке в определенное время. В таких библиотеках фрагменты инсерцируются (включаются) в подходящие вектора, напр, космидные (см. Космида) или бактериальные векторы, и трансформируются (см. Трансформация) в подходящего хозяина. В идеале геномная библиотека должна содержать практически весь геном вида, из которого она происходит, а библиотека кДНК

— все различные молекулы иРНК данной клетки на одной и той же стадии развития. Сейчас сконструировано множество типов генных библиотек для различных целей исследования.

Блоттинг (**blotting –** промакание) — этап процесса Саузерн-блот гибридизации, в результате которой весь электрофоретический спектр ДНК отпечатывается (blotting) за счет капиллярных сил на приложенной к гелю нитроцеллюлозной мембране (пленке), после чего фиксируется при помощи высокой температуры.

В

Вектор, переносчик — молекула ДНК, способная самостоятельно реплицироваться в клетках различных организмов, включать в себя чужеродную ДНК и обеспечивать размножение (клонирование) и работу (экспрессию) встроенного в неё искусственно какого-либо гена. Является инструментом генной инженерии, обеспечивающим доставку (перенос) генетической информации в клетку-реципиент и ее клонирование (см.).

λ вектор — вектор сконструированный на базе фага λ (см.), использующийся при клонировании достаточно больших фрагментов чужеродной ДНК длиной около 15 кб.

Величина генома (*genome size)* — количество пар оснований (п. о.) в расчете на гаплоидный геном (см. Гаплоидный набор).

Вирусы — формы внеклеточной жизни, которые состоят из ДНК (ДНК-вирусы: аденовирусы, бакуловирусы, геминивирусы и др.) или РНК (РНК-вирусы: бромовирусы, ретровирусы и др.) и белковой оболочки. В. не содержат клеточных органелл и используют для репликации метаболизм клетки хозяина. Клетка хозяина может быть разрушена в процессе репликации, и В. освобождается из клетки. В., патогенные для бактерий называют бактериофагами (см.).

Вирус *sv*-40, вирус обезьян — полиомавирус, геном которого состоит из кольцевой двунитчатой молекулы ДНК размером в 5,2 кб, содержащей 5 генов. Впервые был обнаружен у зеленой африканской обезьяны (зеленой мартышки) *Cercopithecus aethiops.* Инфицирует культивируемые клетки приматов, исключая человека. Размножение В. о. приводит к образованию до 100 000 вирусных частиц в одной клетке — это его свойство позволяет использовать вирусную ДНК в качестве эффективного вектора в генной инженерии.

Вырожденность кода — в молекулярной биологии генетический код (см.) является вырожденным, поскольку одна аминокислота кодируется более чем одним нуклеотидным триплетом, кодоном (см.). Напр., тирозин кодируется двумя триплетами УАУ и УАЦ, а лейцин может кодироваться даже шестью.

Г

***β*-галактозидаза** (*β-galactosidase)* — фермент, который катализирует расщепление лактозы на глюкозу и галактозу. У *E. coli β.*-г. является тетрамером,

кодируемым *lac-Z*-геном, размером 5000 Д. β.-г. относится к группе адаптивных ферментов, т. е. его синтез возможен только при наличии субстрата (лактозы) во внешней среде.

Гель — желеобразный матрикс, состоящий из полимерного компонента и буферного раствора, используется для разделения в процессе электрофореза макромолекул ДНК (агарозный Г.), РНК (агарозный, полиакриламидный Г.) или белков (полиакриламидный или крахмальный, Г.).

Ген — основная физическая и функциональная единица наследственности, несущая информацию от одного поколения к другому. Г. представляет собой специфическую последовательность нуклеотидов в ДНК, а у некоторых вирусов — в РНК, детерминирующих или нуклеотидную последовательность транспортных РНК (тДНК), или рибосомных РНК (рДНК), или последовательность аминокислот в белках. Как правило, Г. состоят из кодирующих (экзоны) и некодирующих (интроны) последовательностей. Интронные последовательности чаще всего встречаются у эукариот. Любой Г., занимает строго определенное место, или локус, в хромосоме и может мутировать в различные аллельные состояния, а также рекомбинировать с гомологичными генами. Действие Г. проявляется в фенотипе. По выполняемым функциям Г. подразделяют на 3 класса: а) структурные Г., которые транскрибируются (см. Транскрипция) на ДНК, а затем транслируются на рибосомах (см. Трансляция) в полипептидные цепочки; б) структурные Г., которые транскрибируются в рРНК или тРНК и сами непосредственно используются; в) регуляторные Г., которые транскрибируются, но служат сайтами узнавания (см.) для ферментов и др. белков при репликации и транскрипции ДНК. Термин введен В. Иогансеном в 1909 г. и нередко заменяется понятиями "наследственный фактор".

Ген устойчивости — ген, кодирующий белок, который катализирует разрушение токсина. Г. у. часто используются в векторах клонирования (см.) для облегчения отбора трансформантов (напр., ген антибиотикоустойчивости и др.).

Генетическая инженерия, генная и. — 1. Наука о генетическом конструировании, направленном создании новых форм биологически активных ДНК и генетически новых форм клеток и целых организмов с помощью искусственных приемов переноса генов (технологии рекомбинантных ДНК, генетической трансформации, гибридизации клеток). 2. Экспериментальные разделы молекулярной и клеточной биологии, которые позволяют *in vitro* изменять структуру генов, создавать новые гены или конструировать химерные гены (см. рекомбинантная ДНК). Г. и. возникла в 1972 г., когда впервые П. Берг создал рекомбинантную ДНК, включавшую в себя фрагменты фага-λ, *E. coli* и вируса обезьян *sv*40 (см.).

Генетическая трансформация *(genetic transformation)* — см. Трансформация.

Генетические карты — карты линейного расположения генов на хромосоме

(группы сцепления), выявленные в экспериментах по генетическим рекомбинациям, а также распределение генов по разным хромосомам, как правило, с указанием генетического расстояния между ними.

Генетический код — система записи наследственной информации в молекулах нуклеиновых кислот (см.), основанная на определенном чередовании последовательностей нуклеотидов в ДНК или РНК, образующих кодоны (см.) соответствующих аминокислот белков. Каждый кодон кодирует одну молекулу аминокислоты. Г. к. триплетен (см. Триплет) — 3 нуклеотида кодируют 1 аминокислоту. Последовательности нуклеотидов в иРНК (см. РНК информационная) обозначены от 5' до 3', т. е. слева направо, т. к. имеется определенная направленность трансляции (см.). Код называют вырожденным (см. Вырожденность кода), если аминокислота определяется не одним, а большим числом кодонов. Код читается с фиксированной точки старта, в одном направлении, по 3 последовательно следующих друг за другом нуклеотида (триплета). Г. к. универсален для всех живых организмов.

Генная дактилоскопия — точная идентификация (дактилоскопия) личности на основе молекулярно-генетического анализа индивидуальных образцов ДНК (см. ДНК-фингерпритинг, Фингерпринт ДНК).

Геном (*genom*) — совокупность генов, характерных для гаплоидного набора хромосом данного вида организмов. Основной гаплоидный набор хромосом.

Геномная библиотека (*genomic library)* — набор клонированных (см. Клонирование) фрагментов ДНК, представляющих индивидуальный (видовой) геном (см. Библиотека генов, Банк генов). У млекопитающих (в т. ч. у человека) геномы крупные, поэтому для них обычно создают хромосомные библиотеки (см.).

Гекомная ДНК (*geitomic DNA)* — 1. Вся хромосомная ДНК организма; 2. Ядерная ДНК в клетках эукариот (см. Дезоксирибонуклеиновая кислота).

Гибридная (рекомбинантная) ДНК — новая последовательность ДНК, образованная *in vitro* путем лигирования (см.) двух или более негомологичных молекул ДНК. Напр., рекомбинантная плазмида (см.), содержащая одну или более вставок чужеродной ДНК, которые включены в сайт клонирования или в полилинкер. Организмы, содержащие такие *in vitro* сконструированные ДНК, также относятся к рекомбинантам (рекомбинантный фаг, бактерия). Рек. ДНК широко используется в генетической инженерии *in vitro.*

Д

Двухцепочечная молекула кДНК — см. кДНК, комплементарная ДНК.

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) — высокомолекулярный полимер, состоящий из четырех дезоксирибонуклеотидов (А, Т, Ц, Г), апериодическим чередованием которых кодируется генетическая информация вирусов, бактерий и высших организмов. ДНК может быть однонитчатой (*ss*ДНК), как, напр., у некоторых вирусов, или двунитчатой (*ds*ДНК) у всех высших организмов. У двунитчатой ДНК две комплементарные нити закручены в спираль, одна нить вокруг другой с противоположной

ориентацией (антипараллельны, 5' → → → 3' и, наоборот, 3' → → → 5'). Две нити удерживаются вместе водородными связями между комплементарными основаниями (А = Т; Г = Ц). ДНК способна к самоудвоению, что обеспечивает генетическую преемственность между поколениями в процессе размножения. Нарушение последовательностей нуклеотидов в цепи ДНК приводит к наследственным изменениям — мутациям.

Денатурация ДНК — представляет собой процесс разъединения двойной спирали нуклеиновых кислот на комплементарные одноцепочечные нити под действием физических и химических факторов (температуры, давления, рН и др.).

ДНК-ДНК гибридизация *(DNA-DNA hybridization)* — процесс образования двухцепочечной ДНК из двух комплементарных однонитчатых молекул ДНК.

ДНК-лигаза — фермент, который катализирует образование фосфодиэфирных связей между соседними нуклеотидами в молекуле ДНК. Связи образуются между С—С, С—S, С—О и С—N за счет энергии сопряженной реакции гидролиза. В технологии рекомбинантной ДНК используются в основном две ДНК-л., выделенные из *E. coli* и *T4*. ДНК-л. соединяет две молекулы ДНК путем лигирования (см.) тупых или липких концов. Впервые была выделена Б. Вейсом и К. Ричардсоном в 1966 г.

ДНК-зонд (проба) — определенная (известная) радиоактивно- и нерадиоактивно меченая последовательность нуклеиновой кислоты, используемая в молекулярном клонировании для идентификации специфических молекул ДНК, имеющих комплементарные последовательности. Для этого используется радиоавтография или к.-л. др. система детекции (обнаружения) нерадиоактивно меченого зонда.

ДНК-полимеразы *(DNA-polymerases)* — ферменты, участвующие в синтезе ДНК. У E. coli были выделены 3 типа ДНК-п.: *pol I, pol II* и *pol III. Pol III* является основным ферментом, ответственным за репликацию (см.) ДНК в клетке бактерий. Два др. фермента функционируют преимущественно при восстановлении (репарации) ДНК. Эукариоты содержат множество видов ДНК-п., находящихся в разных частях клетки: в ядре, цитоплазме или митохондриях, и выполняют различные функции, такие, как репликация. репарация и рекомбинация.

ДНК-фингерпринтинг, метод (техника) создания фингерпринта (*DNA fingerprinting or DNA fingerprint technique)* — (см. Фингерпринт ДНК), для чего геномная ДНК рестриктируется эндонуклеазами (см.), образующиеся фрагменты разделяются при помощи гелевого электрофореза (см.), переносятся на мембраны (нитроцеллюлозные фильтры, см.) и гибридизуются с мечеными зондами (с.м.) для фингерпринта (ДНК фага *M13*, различные синтетические олигонуклеотиды, кДНК; геномные зонды, содержащие последовательности генов; мини- и микросателлиты ДНК). В случае наличия в исследуемой ДНК участков, гомологичных зондам, образуются полиморфные

полосы гибридизации, как правило, специфичные для каждого образца ДНК. Поэтому метод может быть использован для генетической идентификации (дактилоскопии) индивидуумов одного вида. Применяется при картировании геномов, выяснении отцовства, в криминалистике.

Е

***Escherichia coli, E. coli*, кишечная палочка** — грамотрицательная кишечная бактерия, широко известная в молекулярной биологии. Её геном (хромосома) включает ок. 4500 кб ДНК, организованных в 50 независимых топологических доменов, и содержит серию инсерций. В н. вр. практически весь геном секвенирован и более 1000 генов картированы. *E. coli* имеет большое значение для экспериментальных исследований рекомбинантной ДНК (см.), т. к. она служит хозяином для большого числа разных вирусов, плазмид и космидного клонирования векторов (см. Вектор клонирования. Космида).

EcoRI — одна из широко применяемых рестрикционных эндонуклеаз, или рестриктаз (см.), извлекаемая из *Escherichia coli*, которая в двухцепочечной ДНК узнает последовательность из шести нуклеотидов ГААТТЦ и разрезает ее между Г и А, образуя липкие концы (см.). В н. вр. выделено 7 рестриктаз группы *EcoR* — от *EcoRI* до *EcoRVII*.

И

Информационная (матричная) РНК (и-РНК, мРНК) — форма РНК, осуществляющая передачу записанной в ДНК информации к местам синтеза белка, состоит из одной цепи, содержит от одной до десяти тысяч пар оснований.

Интроны, интрогенные районы (*introns or intragenic regions or intervening sequences)* — последовательности нуклеотидов у эукариотических генов, транскрибируемых в про-иРНК, которые затем вырезаются и деградируют в ядре. Остающиеся последовательности транскрипта (см. Экзоны) соединяются, образуя зрелую информационную РНК (см.), с которой осуществляется трансляция белка. Т. обр., И. никогда не присутствуют в белке. И. различаются по длине (от 50 до 12000 нуклеотидов), по их числу на один ген (один и более) и по последовательности нуклеотидов. Однако в большинстве И. пограничные сайты между И. и экзоном идентичны. Эти пограничные участки обеспечивают правильное вырезание (эксцизию, см.) И. и сплайсинг экзонов.

Искусственные генетические структуры — целенаправленно сконструированные (созданные) новые формы биологически активных ДНК и генетически новые формы клеток с помощью искусственных приёмов переноса фрагментов ДНК, целых генов или их частей.

***In vitro* (лат.), "в пробирке"** — биологические процессы, смоделированные при их экспериментальном изучении в условиях изоляции от всего (целого) организма, т. е. "в пробирке", напр., культура ткани, фермент-субстратная реакция и т.д.

К

Картирование (*mapping)* — установление позиций генов или каких-то определенных сайтов (см.) вдоль нити ДНК (см. Генетические карты, Рестрикционные карты).

Картирование генов *(gene mapping)* — установление линейной организации генов, определение относительной локализации генов на хромосомах (см. Хромосомные карты) или плазмидах (кольцевая карта сцепления) и относительного расстояния между ними. Генетические карты можно создавать на основе анализа рекомбинаций (см.), принятого в классической генетике, или на основе данных молекулярной генетики, т, е. напрямую используя данные сиквенса ДНК (см. Сиквенирование ДНК).

Кб, килобаза *(kb, kilobase)* — единица, используемая для выражения размера нуклеиновых кислот (см.), 1 кб = 1000 нуклеотидов, или пар оснований (п. о.), в двухцепочечной ДНК.

кДНК, комплементарная ДНК *(cDNA, complementary DNA)* — одно- или двунитчатая молекула ДНК, комплементарная молекуле иРНК. Образуется при обратной транскрипции иРНК с помощью обратной транскриптазы (см.) *in vitro.* кДНК соответствует определенному гену без интронов.

Кишечная палочка — см. ***Escherichia coli***.

Клонирование *(cloning or molecular c.)* — получение клонов (см.) с помощью одного или многих методических приемов. Различают клонирование генов — выделение и амплификация отдельных генов в реципиентных клетках, а также молекулярное клонирование — размножение молекул ДНК в составе вектора.

Клонирование гена *(gene cloning)* — см. Клонирование

Клонирование ДНК (*DNA cloning)* — использование технологии рекомбинантной ДНК для инсерции (включения) фрагмента ДНК, напр, гена, в клонирующий вектор (см.) и размножение этой последовательности путем трансформации вектора в подходящую клетку-хозяина, напр, в клетки кишечной палочки.

Кодон — последовательность из трех соседних нуклеотидов в ДНК или РНК, кодирующая определенную аминокислоту либо начало и конец трансляции (см.), т. е. это дискретная единица генетического кода. Всего возможно 64 сочетания нуклеотидов в триплетах — 61 из них кодирует 20 аминокислот, а 3 являются нонсенс-кодонами (см. Стоп-кодон).

Кольцевые молекулы ДНК — см. плазмиды (кольцевые).

3'-Конец *(3'-carbon atom end or 3'-terminus)* — один из концов линейной молекулы ДНК или РНК, несущий нуклеотид со свободной гидроксильной группой (OH^-) у 3'-атома углерода рибозы или дезоксирибозы.

5'-Конец *(5'-carbon atom end or 3'-terminus)* — один из концов линейной молекулы ДНК или РНК, несущий нуклеотид со свободной гидроксильной (OH^-) группой у 5'-атома углерода рибозы или дезоксирибозы. С 5'-конца начинается синтез полинуклеотидных цепей в процессе репликации (см.), транскрипции (см.) и репарации (см.).

Конкатамер ДНК *(DNA concatemer)* — структура из нескольких повторяющихся (одна за другой) единиц гена. У некоторых фагов (напр., фагλ и *T4)* геном во время репликации представлен в виде конкатамерных молекул — больших молекул ДНК, образованных из нескольких тандемно повторяющихся единиц генома.

Конструирование гибридных молекул ДНК — создание новых форм биологически активных ДНК с помощью искусственных приёмов переноса и сшивания различных фрагментов ДНК.

Концевая (терминальная) трансфераза (*terminal transferase)* — фермент, катализирующий достройку 10-40 дезоксинуклеотид-5'-трифосфатов к 3'-ОН-группам обоих концов двунитчатой ДНК или к однонитчатой ДНК, образуя 3'-гомополимерное удлинение нити (полидезоксиаденилат) и освобождая неорганический пирофосфат. Фермент используется для радиоактивного мечения молекулы ДНК и образования гомополимерных хвостов на 3'-концах ДНК. Т. т. широко используется в технологиях рекомбинантной ДНК (см.).

Космиды — векторная плазмида, содержащая *cos*-участок *(cos*-сайт) ДНК фага лямбда, являющийся местом замыкания его линейной формы в кольцо. Благодаря наличию *cos*-участка К., включающая чужеродные гены, может быть упакована в головку фага *in vitro.* Метод клонирования ДНК с использованием К. разработан Дж. Коллинзом и Б. Холманом в 1977 г.

Л

***lac-Z*-ген** (*lac-Z-gene)* — ген лактозного оперона *E. coli,* кодирующего *β*-галактозидазу. Этот фермент катализирует превращение дисахаридов лактозы в моносахариды и глюкозу. *lac-Z-ген* входит в состав различных клонирующих векторов и выполняет роль репортерного гена (см.) в экспериментах по трансформации.

Лигаза, синтетаза — см. ДНК-лигаза.

Лигирование *(ligalion)* — 1. Процесс ковалентного соединения двух линейных молекул нуклеиновых кислот посредством фосфодиэфирных связей, осуществляемый с участием фермента лигазы. 2. Прием в генетической инженерии, в ходе которого чужеродная ДНК встраивается между двумя концами плазмидной ДНК с помощью фермента лигазы (см.).

Лизирование, лизис (*lysis)* — разрушение растворение вирусами, клеток хозяина под действием ферментов, содержащихся в лизосомах и выделяемых инфицирующими вирусными частицами, в результате чего в среду высвобождается новое потомство вируса.

Лизогения (*lysogeny or lisogenicity)* — состояние бактериальной клетки, при котором в ее хромосоме находится один или несколько встроившихся умеренных бактериофагов (профагов) и при этом не инициируется синтез фагового материала, а профаги репродуцируются вместе с хромосомами хозяина, передаваясь при каждом клеточном делении в дочерние клетки. При Л. бактериофаг сохраняет способность выходить из генома клетки-хозяина.

Линкер, линкерная ДНК *(linker, l. DNA)* — Синтетический

олигодезоксирибонуклеотид определенной последовательности, содержащий один или несколько сайтов узнавания (см.) для рестрикционных эндонуклеаз (см.). Л. может быть лигирован к любому тупому концу (см.) дуплексной ДНК с помощью *Т4*ДНК-лигазы (см.).

Липкий конец — термин, относящийся к двунитчатой молекуле ДНК, у которой одна нить длиннее ("выступающая"), чем другая ("заглубленная"). Выступающий участок нити может спариваться с др., комплементарным ему выступающим (липким) концом. Пример: два коротких (12 нуклеотидов) однонитчатых 5'-выступов на каждом конце линейного генома фага лямбда (cos-сайт). Эти Л. к. комплементарны по последовательностям нуклеотидов друг другу и могут спариваться, образуя кольцевую ДНК.

М

Маркер для селекции (селективный маркер) — специальный ген, кодирующий устойчивость к к.-л. антибиотику (напр., канамицину), который вводят в вектор для последующего отбора трансформантов.

Минисателлиты (*minisatelliles)* — короткие (9-64 н.п.), среднеповторяющиеся, тандемно организованные, высоко-вариабельные последовательности ДНК (обычно богатые ГЦ-последовательностями), рассредоточенные по геному человека (встречаются также у растений и животных). Они имеют одну общую короткую последовательность в 10-35 н.п. М.-с. проявляют значительный полиморфизм по длине, который возникает в результате неравного кроссинговера). В итоге в М.-с. изменяется число коротких тандемных повторов (см.), что ведет к образованию последовательностей длиной от 0,1 до 20 кб. Короткий тандемно повторяющийся М.-с., являясь хорошим генетическим маркером для анализа сцепления (см. ДНК-фингерпринтинг), может использоваться в качестве гибридизационного зонда для одновременного обнаружения высокополиморфных М.-с. в пределах рестриктов ДНК. Вероятность идентичности того же набора фрагментов ДНК у двух человек теоретически настолько мала, что каждый человек считается уникальным по набору полос (за исключением однояйцевых близнецов, см.), выявляющихся в результате гибридизации на радиоавтографах.

Молекула ДНК — см. Дезоксирибонуклеиновая кислота.

Молекулярная биология — область биологии, исследующая проявление жизни на молекулярном уровне. Основное направление М. б. — выяснение роли биологически важных молекул (белков, нуклеиновых кислот и др.) в росте и развитии организмов, хранении и передаче наследственной информации, превращении энергии в живых клетках и т. п. явлениях. М. б. включает в себя молекулярную генетику, молекулярную вирусологию, молекулярную иммунологию и т. д. М. б. сформировалась в середине XX в. и бурно развивается в наши дни.

Молекулярная генетика — раздел современной генетики, изучающий

закономерности и молекулярные механизмы хранения, воспроизведения и передачи наследственных признаков.

Н

Наследственно измененные организмы — см. Трансгенные организмы. Трансформированные организмы.

Нитроцеллюлозная (пленка) мембрана — состоит из нитроцеллюлозных нитей, образующих поры определенного размера (0,45μм). Селективно (выборочно) улавливают двунитчатую ДНК или ДНК-РНК-гибриды, но свободно пропускают однонитчатые молекулы. Однонитчатые ДНК и РНК также могут задерживаться на Н. м., если ее проинкубировать при 80 °С в течение 2 ч (спекание). Такие блоты (пленки) используются в Саузерн- и Нозерн-блот экспериментах.

Нуклеотиды — органические вещества, состоящие из пуринового или пиримидинового основания, сахара рибозы (дезоксирибозы) и фосфорной кислоты; составная часть нуклеиновых кислот и многих коферментов (НАД, НАДФ, кофермента А и др.). Н. также называют нуклеозидфосфатами: аденозинмонофосфат (АМФ), гуанозинмонофосфат (ГМФ), цитидинмонофосфат (ЦМФ), уридинмонофосфат (УМФ) и тимидинмонофосфат (ТМФ). Н. являются некоторые макроэргические соединения, напр. АТФ.

О

Обратная транскриптаза, РНК-зависимая ДНК-полимераза, ревертаза (*reverse transcriptase, RNA-dependent DNA-polymerase)* — ретровирусный многофункциональный фермент класса трансфераз, синтезирующий двунитчатую ДНК с использованием в качестве матрицы однонитчатой РНК. О. т. широко используются в ДНК-рекомбинантной технологии для синтеза кДНК (см.) с информационной РНК и в генной инженерии для получения нужных ДНК *in vitro.* У некоторых ретровирусов (см.) О. т. является мономером, у других — димером.

Олиго(dT) праймер (*oligo(dT) primer* — синтетический гомополимерный олигодезоксирибонуклеотид, который может быть подсоединен к поли(А)хвосту (см.) полиаденилированной иРНК и использоваться как праймер (см.) для синтеза первой нити кДНК с помощью обратной транскриптазы.

П

Первая рекомбинантная (гибридная) молекула ДНК — создана в 1972 г. П. Бергом, которая включала в себя фрагменты фага λ, *E. coli* и вируса обезьян *sv-40.*

Плазмиды — внехромосомный (экстрахромосомный) генетический элемент, кольцевая, автономно реплицирующаяся дуплексная молекула ДНК, имеющая размеры от 1 до 200 и более кб и от одной до нескольких сот копий на бактериальную клетку. Число копий П. может зависеть от факторов среды. П. обычно придают селективные преимущества клетке хозяина (напр., устойчивость к антибиотикам). Конъюгативные П. имеют набор генов,

обеспечивающих их перенос в др. клетки. Бактериальные П. широко используются для конструирования векторов клонирования. Термин «П.» предложен Дж. Ледербергом и др. в 1952.

Плазмида pBR322 — серия сравнительно небольших, мультикопийных и неконъюгативных плазмидных векторов клонирования, содержащих гены устойчивости к ампициллину и тетрациклину, а также несколько уникальных сайтов клонирования (или полилинкеры). Сайты клонирования локализованы в пределах одного из генов устойчивости. Это позволяет обнаруживать инсерцированную чужеродную ДНК по исчезновению устойчивости к антибиотику на селективной среде. Плазмида синтезирована в 1977 г. мексиканскими исследователями Боливаром и Родригесом. Они использовали ген тетрациклин-устойчивости от *pSC*101*,* ориджин репликации *ori* и *rep*-ген от *ColE1,* а ген ампициллин-устойчивости — от транспозона *Tn 3*. Плазмида реплицируется в *E. coli*.

Плазмида pSC101 — первая плазмида, которую начали использовать в генной инженерии. Несет только один сайт рестрикции для EcoR1 и превращается под действием этого фермента из кольцевой в линейную молекулу, концы которой могут «слипаться» между собой или с любыми фрагментами другой ДНК, полученными под действием той же рестриктазы. Обладает геном устойчивости к антибиотику тетрациклину и поэтому легко обнаруживается в бактериях на среде с этим антибиотиком. Все эти свойства pSC101 и были использованы для создания и клонирования первых гибридных (рекомбинантных) ДНК (см.).

Плазмида pUC18 — один из серии относительно мелких *E. coli* плазмидных векторов клонирования (см.), содержащий *PvuII / EcoR*-фрагмент из pBR322 (см.) с amp^r геном, кодирующим ампинициллин-устойчивость, ориджином репликации *ori* (см.) и последовательностями, кодирующими α-пептид *lac-Z*-гена (β-галактозидазы) с полилинкером (см.). Инсерция чужеродной ДНК в полилинкер приводит к нарушению β-галактозидазного гена. В этом случае хозяйская бактериальная клетка образует бесцветные колонии, если она растет на среде с ампициллином и субстратом *X-gal*, который должен расщепляться при помощи β-галактозидазы. Штаммы, трансформированные плазмидой pUC18 без вставки чужеродной ДНК на той же среде с *X-gal*, образуют колонии окрашенные в синий цвет. Т. обр., можно легко отбирать рекомбинантные (т. е. с чужеродной ДНК) колонии.

Поли(А), полиаденилат (*poly(A) or polyadenylate)* — гомополимер, содержащий остатки адениновых нуклеотидов. Практически все мРНК эукариот на своих 3'-концах содержат последовательность поли(А) или поли(А) хвост.

Полилинкер, сайт множественного клонирования (*polylinker or multiple cloning site)* — синтетический двунитчатый олигонуктлеотид, содержащий много сайтов рестрикции (см.). П. вводят в векторы, чтобы расширить их возможности для клонирования чужеродных ДНК в любом из этих сайтов.

Последовательность узнавания — см. Сайт узнавания.

Правило Чаргаффа — правило, гласящее, что в любой двунитчатой молекуле ДНК число адениновых оснований всегда равно числу тиминовых (А = Т), а число гуаниновых — числу цитозиновых (Г = Ц) оснований. Согласно П. Ч. количество пиримидинов (Т + Ц) равно сумме пуринов (А + Г). П. Ч. открыто в 1950 г. и лежит в основе классической модели ДНК Уотсона—Крика.

Праймер, затравка *(primer)* — короткий олигонуклеотид ДНК или РНК, комплементарный участку более длинной молекулы ДНК или РНК. К его 3'-ОН-концу ДНК-полимераза (см.) может добавлять нуклеотиды в растущую цепь ДНК в 5'—3'-направлении. У прокариот РНК-полимераза (см.) катализирует синтез таких РНК-праймерои для репликации ДНК. П. также нужны для РНК-зависимой ДНК-полимеразы (обратной транскриптазы, см), *In vitro* (см.) используются синтетические П. размером до 10 п. о. для реакции полимеризации ДНК с помощью ДНК-полимеразы или обратной транскриптазы, П. нужны для синтеза кДНК, ДНК секвенирования по Сэнгеру (см.), ПЦР и др.

Принцип комплементарности — пространственная взаимодополняемость (взаимное соответствие) поверхностей взаимодействующих молекул или их частей, приводящая, как правило, к образованию вторичных (Ван-дер-Вальсовых, водородных, ионных) связей между ними. Уникальность и прочность комплементарных структур определяется высокой избирательностью, большой площадью взаимодействия на уровне атомных группировок или зарядов по принципу «ключ - замок» (комплексы антиген – антитело и фермент – субстрат, четвертичная структура белков, вторичная и третичная структура нуклеиновых кислот). Наиб. ярко К. проявилась в структуре двуспиральных ДНК и РНК, где две полинуклеотидные цепи образуют в результате комплементарного взаимодействия пар пуриновых и пиримидиновых оснований (А-Т, Г-Ц) двуспиральную молекулу. Уникальная вторичная и третичная структура одноцепочечных полинуклеотидов (тРНК, рРНК) также определяется комплементарным спариванием оснований с образованием «петель» и «шпилек» вдоль по цепи. К. лежит в основе мн. явлений биол. специфичности, связанных с «узнаванием» на молекулярном уровне.

Р

Радиоактивно меченный ДНКовый зонд — см. ДНКовый зонд.

Разделение рестрикционных фрагментов ДНК — см. Электрофорез в агарозном геле.

Распознаваемые участки — см. Сайты распознавания.

Репликация — процесс точного самовоспроизведения молекул нуклеиновых кислот, сопровождающийся передачей точных копий генетической информации в ряду поколений. Термин Р. в основном используется для определения процесса синтеза новой нити ДНК на матричной нити ДНК с целью точного копирования информации, содержащейся в геноме. Р. ДНК является полуконсервативной. Основные стадии этого процесса включают

разделение нитей ДНК с образованием репликативной вилки, связывание ДНК-полимеразы и добавление комплементарных нуклеотидов начиная с 3'-конца. Нить, непрерывно реплицирующаяся (ведущая нить, лидерная нить), должна отделяться от др. (запаздывающей) нити, которая реплицируется прерывисто, короткими кусками (фрагменты Оказаки). После синтеза фрагменты Оказаки лигируются (с участием ДНК-лигазы), образуя целую запаздывающую нить.

Репортерный ген *(reporter gene)* — ген, хорошо изученный генетически и биохимически, который легко может быть сшит с регуляторной областью др. генов. Его активность в норме не обнаруживается в организме, в который этот ген переносится. Активность большинства Р. г. можно легко протестировать достаточно простыми методами (напр., определением ферментативной активности белкового продукта для галактозидазы, β-глюкуронидазы, хлорамфениколацетилтрансферазы, люциферазы, неомицин фосфотрансферазы, нопалинсинтазы и др.).

Рестриктазы — ферменты рестрикции, разрезающие ДНК по определенным нуклеотидным последовательностям, называемым сайтами рестрикции (см.). Р. могут кодироваться не только геномом бактерий, но также плазмидами и бактериофагами. Являются одним из главных инструментов генной инженерии, широко используются для получения рекомбинантных ДНК(см.). Синоним – рестрикционные эндонуклеазы.

Рестрикционные карты — диаграмма расположения на молекуле ДНК сайтов узнавания (см.) рестриктазами. Самыми полными являются Р. к., построенные для небольших молекул ДНК (напр., хромосом прокариот). Первую полную физическую карту расположения участков 14 рестриктаз составил Д. Натанс для ДНК вируса sv-40.

Реципиентный организм, реципиент — 1. Любая клетка или организм, получающий: а) новую генетическую информацию в форме чужеродной ДНК или РНК; б) к.-л. биологический материал от др. организма-донора. 2. Клетка, принимающая генетический материал при трансдукции и конъюгации.

Ровные (тупые) концы — термин, относящийся к двухцепочечным фрагментам ДНК у которых ни одна нить на концевых участках не выступает за другую в отличие от липких концов (см.). Р.к. образуются в результате действия рестриктаз (рестрикционных эндонуклеаз) *Alu I, Ecor V, Hpa I, Nac I, Pvu II, Sma I* и др., а также путем удаления однонитчатых концов с помощью S1-нуклеазы или достройки их с помощью ДНК-полимеразы I.

Рибонуклеиновая кислота (РНК) — чаще всего однонитчатый полинуклеотид, характеризующийся наличием в нем сахара рибозы и урацила (вместо дезоксирибозы и тимина в ДНК). Обеспечивает передачу генетической информации (информационная иРНК и транспортная тРНК), служит в качестве структурного каркаса для рибосом (рибосомная рРНК) и выполняет ферментативные функции (рибозимы). Около 90% всей клеточной РНК составляет рРНК, около 8% составляет тРНК, а на долю иРНК приходится

менее 2%. У эукариот молекулы РНК, как правило, транскрибируются в виде больших молекул (предшественников про-РНК), а затем путем сплайсинга и др. посттранскрипционных модификаций преобразуются в активные (зрелые) формы, имеющие меньшие (иногда существенно) размеры. У про- и эукариот функции РНК сильно различаются. У многих вирусов вся генетическая информация вместо ДНК содержится в одно- и двунитчатых РНК.

Рибосома — органоид клетки, с помощью которого осуществляется биосинтез белка. Р. представляет собой асимметричную рибонуклеопротеидную частицу диаметром 10—20 μm, которая состоит из двух субъединиц и обладающая каталитической функцией, ответственной за образование пептидных связей, т. е. за полимеризацию аминокислотных остатков в полипептидную цепь белка. При связывании Р. с информационной РНК начинается синтез полипептидов. Малая субъединица содержит единственную цепь рРНК (16*S* — у прокариот, хлоропластов и растений, 18*S* рРНК — у животных), ассоциированную с рибосомным белком (5-белки), которая связывается с иРНК. Крупная субъединица является комплексом единственной большой цепи рРНК (23*S* рРНК — у прокариот, 25*S* — у растений и митохондрий, 28*S* — у животных), одной или двух малых рРНК (5*S*— у прокариот, 5*S* и 5,8*S*— у эукариот) и рибосомных *L*-белков. Этот комплекс несет сайт для присоединения 2—3 молекул транспортной РНК.

С

Сайт клонирования — место (сайт) расщепления ДНК определенной рестриктазой в векторе клонирования, которое локализовано в пределах одного из генов устойчивости. Это позволяет обнаруживать инсерцированную чужеродную ДНК по исчезновению устойчивости к антибиотику на селективной среде в процессе клонирования (см.).

Сайт рестрикции — последовательность пар оснований в молекуле ДНК, в месте расположения которой определенная рестрикционная нуклеаза разрезает (расщепляет) ее.

Сайт узнавания — специфическая последовательность ДНК, с которой связываются рестрикционные эндонуклеазы, а также начинается расщепление молекулы ДНК данным ферментом. Для каждой рестриктазы имеется собственная специфическая последовательность узнавания. Обычно С. у. представлен коротким палиндромом.

***Cos*-сайты** *(cos-sites)* — однонитчатые, комплементарные участки на обоих концах ДНК фага лямбда (см. Липкие концы), состоящие из 12 нуклеотидов. Обеспечивают фагу образование кольцевых структур путем соединения водородными связями комплементарных концов и упаковку ДНК в фаговые частицы. С. *cos* используются для конструирования космид (см.).

Самостоятельная репликация — способность ряда внехромосомных генетических элементов (плазмид) к автономной репликации.

Саузерн-блот анализ — анализ молекул ДНК и их фрагментов при помощи метода блот-гибридизации по Саузерну.

Саузерн-блот гибридизация — метод, позволяющий идентифицировать конкретные гены и другие рестрикционные фрагменты ДНК после их электрофоретического разделения. Суть метода заключается в том, что сначала фрагменты ДНК, разделенные в агарозном геле, денатурируются до одноцепочечных молекул, а затем весь электрофоретический спектр ДНК отпечатывается (blotting) за счет капиллярных сил на приложенной к гелю нитроцеллюлозной мембране (пленке), после чего фиксируется при помощи высокой температуры. Далее мембрана помещается в гибридизационный буфер, содержащий специальный радиоактивно меченный ДНКовый зонд – короткую специфическую последовательность ДНК. Зонд способен гибридизоваться с определенным комплементарным фрагментом ДНК и свяжется только с одной или несколькими конкретными фракциями из всего электрофоретического спектра полученных рестрикционных фрагментов ДНК. На последнем этапе к нитроцеллюлозной мембране, содержащей весь спектр полученных фрагментов ДНК, включая фракции гибридизовавшиеся с радиоактивно меченым зондом, прикладывают рентгеновскую пленку. На пленке (авторадиограмме) после экспозиции выявляются засвеченные места, соответствующие расположению меченых фракций ДНК. Метод разработан Э. Саузерном и Р. Дейвисом в 1975 г.

Светящиеся фракции ДНК — двунитчатые фракции ДНК в агарозном или полиакриламидном геле, окрашенные красителем этидий бромидом, в комплексе с которым приобретают малиновую окраску при УФ освещении.

Сиквенирование ДНК (*DNA sequencing)* — метод определения последовательности оснований в молекуле ДНК. Существует несколько методов секвенирования: автоматическое, химическое, прямое, секвенирование по Максаму-Гил-берту, Сэнгеру и др.

Сиквенирование ДНК по Максаму-Гилберту, химический метод (*Maxam-Gilbert sequencing or chemical s.)* — один из наиболее распространенных методов определения первичной последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК, Вначале ДНК режется на фрагменты размером 0,6—2,0 кб, концы фрагментов метятся радиоактивной или нерадиоактивной меткой и плавятся для получения однонитчатых молекул. Радиоактивное мечение может осуществляться изотопами серы ^{35}S или фосфора ^{32}P, нерадиоактивное мечение — с помощью биотиновой или флуоресцентной метки. После мечения образец ДНК разделяется на 4 части, каждую из которых обрабатывают реагентом, специфически разрушающим одно из четырех оснований ДНК. Условия реакции подбирают таким образом, чтобы на каждую молекулу ДНК приходилось лишь несколько повреждений. Когда эти повреждённые молекулы обрабатывают пиперидином, в ДНК образуется разрыв в том месте, где находилось разрушенное основание. В результате получается набор 5'-меченых меченых фрагментов, длины которых определяются расстоянием от

разрушенного основания до конца молекулы. Фрагменты, полученные в результате 4 типов реакции, подвергаются электрофорезу (см.) в полиакриламидном геле, и затем полосы выявляются соответствующим методом в зависимости от способа мечения. На основе результатов электрофореза определяются нуклеотиды и их последовательность в исходной ДНК.

Сиквенирование ДНК по Сэнгеру, ферментативный метод (*Senger sequencing or enzymatic method s.)* — техника сиквенирования (см.) однонитчатой ДНК. В основе метода — присоединение к однонитчатой ДНК-матрицы секвенирующего праймера (см.) (обычно синтетических олигонуклеотидов). Реакционная смесь переносится в 4 пробирки, куда добавляются все 4 дезоксинуклеозидтрифосфата, один из которых мечен по ^{32}P. Каждая пробирка содержит тпекже различные дидезоксинуклеозидтрифосфаты (ддАТФ, ддЦТФ, ддГТФ и ддТТФ). Для синтеза комплементарной цепи к однонитчатой последовательности-матрицы в пробирки добавляется фермент ДНК-полимераза(см.). В результате происходит удлинение праймера в соответствии с матричной последовательностью. Когда в растущую цепь вместо соответствующего дНТФ в матрице включается ддНТФ, 3'-конец растущей цепи теряет гидроксильную группу и не может дальше удлиняться: цепь терминируется. В итоге каждая реакционная смесь получит набор радиоактивно меченных фрагментов ДНК с общим 5'-концом (праймер), но с разными 3'-концами. После окончания реакции ДНК денатурируется, затем подвергается электрофорезу в полиакриламидном геле (см. Секвенирующий гель) и с помощью радиоавтографии (см.) выявляются радиоактивные полосы. Последовательность нуклеотидов в исходной ДНК-матрице может затем прочитываться прямо с радиоавтограммы.

Скрининг — поиск в генной библиотеке клонов конкретной колонии, содержащей нужный фрагмент чужеродной ДНК.

Создание рекомбинантных ДНК — конструирование новых последовательностей ДНК, образованных *in vitro* путем сшивания двух или более негомологичных молекул ДНК. Первая рекомбинантная ДНК была создана (сконструирована) в 1972 г. П. Бергом и включала в себя фрагменты фага λ, *E. coli* и вируса обезьян *sv40* (см. Первая рекомбинантная (гибридная) молекула ДНК).

Стоп-кодон, нонсенс-к., терминатор — тринуклеотид в информационной РНК, сигнализирующий об окончании синтеза полипептида и освобождении полной полилептидной цепи от рибосомы (см.). Существует три различных типа данных С.-к.: УАГ (амбер), УГА (опал) и УАА (охра). Ни один из них не соответствует антикодону тРНК.

Sma I — одна из рестрикционных эндонуклеаз, или рестриктаз (см.), которая в двухцепочечной ДНК узнает последовательность из шести нуклеотидов ЦЦЦГГГ и разрезает ее между Ц и Г, образуя ровные (тупые) концы (см.).

Т

Таблица (словарь) генетических кодов, с. кодонов (*genetic code table (dictionary))* — таблица, включающая генетические значения отдельных кодонов (см.), или триплетов (см.), соответственно продуктам их функционирования. Содержит 64 кодона, из которых 61 смысловой т.е. каждый из них кодирует конкретную аминокислоту и 3 стоп-кодона (см.), или нонсенс-кодона, которые сигнализируют об окончании синтеза полипептида и освобождении полипептидной цепи от рибосомы (см.).

Тандемный повтор (*tandem repeat)* — Организация двух или более расположенных рядом одинаковых последовательностей в пределах двунитчатой молекулы ДНК. Возможны два типа их ориентации — прямые повторы (голова к хвосту 5' – *ЦГААТЦ* *ГТТАТЦГ* *ГТТАТЦГ* *АЦГГТ* - 3') или непрямые повторы (голова к голове 5' - *ЦГААТЦ* *ЦТТАТЦГ* *ГЦТАТТГ* *АЦЦГТ* - 3'). Т. п. в области кодирующих генов могут вести к тандемноповторяюшимся аминокислотным последовательностям.

Транскрипция — синтез молекул РНК на ДНК- или РНК-матрице, осуществляемый ДНК-зависимой или РНК-зависимой РНК-полимеразой. Т. — первый этап реализации генетической информации, записанной в ДНК, осуществляемый с участием фермента РНК-полимераза у прокариот и не менее 3 типов РНК-полимераз, транскрибирующих гены у эукариот.

Трансляция — считывание (декодирование) информационной РНК, рибосомами (см.) и транслирование этого кода в белок. Процесс Т. начинается с того, что 5'-лидирующее окончание иРНК связывается с рибосомой. Затем иРНК движется через рибосому и служит матрицей для встраивания аминокислот в белок. Как только 5'-лидирующий конец иРНК пройдет через первую рибосому, он может связаться с др. рибосомой, на которой вновь будет происходить повторное декодирование и синтез белка (трансляционная амплификация). Как только 3'-поли(*А*)хвост иРНК выйдет из первой рибосомы, вновь синтезированный белок отделяется, а рибосома может начать следующий цикл Т. Группировка аминокислот в белок, осуществляемая с помощью тРНК, начинается с аминоконца (*N*-конец) и заканчивается карбоксильным концом (*С*-конец). На рибосоме имеются два сайта связывания для тРНК: *Р*- и *А*-сайты. *Р*-сайт (пептидил тРНК-сайт) связывает тРНК, которая прикрепляется к концу исходной полипептидной цепи, а *А*-сайт (аминоацил тРНК-сайт) связывает вновь подходящую тРНК, которая несет следующую аминокислоту. Связывание каждой тРНК с этим сайтом обеспечивает спаривание оснований ее антикодона (см.) с соответствующим кодоном иРНК, движущейся через рибосому. Изменение скорости трансляции иРНК регулирует экспрессию генов.

Транспортная РНК (т-РНК) — низкомолекулярная РНК (содержит 75-90 нуклеотидов), обеспечивающая перенос аминокислот к рибосомам (см.) для включения их в белки. т-РНК имеют специфическую вторичную структуру в виде “листа клевера”, антикодон расположен в антикодоновой петле, а на 5'-

конце всегда находится гуанин (G). Аминокислоты присоединяются к 3'-концу последовательности ССА в тРНК в результате реакции аминоацилирования. Модель "листа клевера" для вторичной структуры тРНК предложена Р. Холли с сотр. в 1965 г.

Трансформация — 1. Перенос генетической информации в бактериальные клетки при помощи изолированной ДНК с участием или без участия плазмид (см.), но всегда без участия вирусов. 2. Направленная модификация генома клетки с помощью очищенной или рекомбинантной ДНК из клетки др. генотипа, которая интегрирует (поглощается) в геном модифицируемой клетки. 3. Изменение морфологии клетки или др. ее характеристик (напр., неопластического роста и др.), происходящее после интеграции нуклеиновой кислоты от онкогенных вирусов в клеточный геном, после воздействия химическими канцерогенами или спонтанно (онкогенная Т.). 4. Изменение наследственных свойств клетки в результате проникновения в нее чужеродной ДНК. Впервые обнаружена в 1928 у пневмококков Ф. Гриффитом.

Трансгенные организмы — организмы, в наследственные структуры которых искусственно введён хотя бы один активно функционирующий ген от другого организма.

Трансформированные организмы — организмы с измененными наследственными свойствами в результате проникновения в них чужеродной ДНК.

Триплет — комбинация из трех последовательно расположенных нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты (см. Кодон).

У

Участок расщепления — см. Сайт рестрикции.

Участок узнавания — см. Сайт узнавания.

Ф

Фаги — см. Бактериофаги.

Ферменты рестрикции — см. Рестриктазы.

Фильтр из нитротцеллюлозной плёнки — см. Нитроцеллюлозная (пленка) мембрана.

Фингерпринт ДНК (*DNA fingerprint)* — высокоспецифичные гибридизационные полосы на электрофореграммах (фингерпринт), образующиеся как результат полиморфизма длины рестрикционных фрагментов геномной ДНК (ПДРФ, см.). Причиной такого полиморфизма могуг быть мутации в пределах сайта рестрикции (см.), повторы ДНК (мини- и микросателлиты) и др.

Фракции гибридизовавшиеся с радиоактивно меченым зондом — часть молекул ДНК, которые после электрофоретического фракционирования

комплементарно связались с радиактивным зондом в процессе Саузерн-блот гибридизации.

Х

X-Gal — специальный субстрат, который расщепляется ферментом β-галактозидазой (продукт гена ***lac-Z***) (см.) с образованием нерастворимого осадка сине-голубого цвета. Широко используется в генной инженерии для детекции (выявления) бактериальных колоний содержащих плазмиды со встроенной чужеродной ДНК.

Химерные плазмиды — плазмиды содержащие вставку (фрагмент) чужеродной ДНК.

Хромосомная библиотека *(chromosome specific library)* — один из видов геномной библиотеки (см.), используемый *для* анализа геномов больших размеров, напр. человека. Х. б. создают клонированием (см.) фрагментов ДНК индивидуальных гомологичных хромосом.

Ч

Чужеродная ДНК — ДНК какого-либо организма по отношению к организму-реципиенту.

Э

Экзоны (*exons)* — последовательности эукариотных генов, которые, как правило, сохраняются при процессинге (см.) про-иРНК и образуют зрелую матричную, или информационную РНК. Э., как правило, чередуются с нитронами (см.). Э. кодируют три принципиально различные функции: а) функцию лидера: первый Э. содержит сигналы для инициации транскрипции (см.) и последовательности с функцией, управляющей присоединением матрицы к рибосомам (см.), и не транслируется (см. Трансляция) в белок; б) функции матрицы (информации); Э. содержат информацию, которая обеспечивает образование белка из отдельных аминокислот; в) терминирующие функции (см. Терминация): последний Э. включает последовательности, которые в зрелой иРНК являются сигналом для окончания трансляции, а также гомополимерное адениловое окончание (хвост) — поли(А) иРНК. Термин экзон предложен У. Гилбертом в 1978 г.

Экспрессия гена — реализация генетической информации, закодированной в ДНК, путем ее транскрипции (см.) и трансляции (см.) иРНК.

Электрофорез в агарозном геле — Метод разделения заряженных биологических макромолекул (белков, нуклеиновых кислот и т. д.) в электрическом поле, базирующийся на их различии по электрическому заряду, форме и размеру. Молекулы мигрируют через инертный агарозный гель под действием электрического поля. Э. открыт Ф. Ф. Рейсом в 1807 г. В биологии Э. начал использовать А. Тизелиус, сконструировавший первый прибор для электрофоретического разделения белков в 30-е гг. XX в.

Электрофоретическая камера — часть прибора для проведения

электрофореза. Различают вертикальную и горизонтальную Э.к.

Элонгация (*elongation)* — удлинение нуклеотидной цепи путем добавления новых нуклеотидов (ДНК- или РНК-синтез) или аминокислотной цепи путем присоединения аминокислот.

Этидиум бромид (3,8-диамино-6-этил-5-фенилфенантридиум бромид) — флуоресцирующий краситель (канцероген), который обладает способностью интеркалировать между парами оснований в двунитчатой ДНК и РНК. Комплекс нуклеиновой кислоты с Э. б. флуоресцирует под УФ светом. Используется для визуального обнаружения двунитчатых молекул ДНК в агарозном и полиакриламидном геле (см.) при флуоресцентном излучении в 590 нм. Э. б. позволяет производить количественную оценку содержания нуклеиновых кислот в препарате.

Полимеразная ценная реакция, ПЦР (*pofymerase chain reaction, PCR*) — процесс амплификации (см.) *in vitro,* при котором фрагмент ДНК длиной до 15 кб может быть амплифицирован (размножен) до 10^8 раз (копий). Для этого синтезируются два олигонуклеотида размером в 10-30 нуклеотидов, комплементарных последовательностям на двух концах исследуемой ДНК. Избыточное количество этих двух олигонуклеотидных праймеров (см.; амплимеров) смешивается с геномной ДНК, смесь нагревается для денатурации дуплексов ДНК. При последующем снижении температуры праймеры присоединяются к их геномным гомологам и могут с помощью ДНК-полимеразы удлиниться, т. е. на ДНК-матрице синтезируется вторая цень. Последовательный процесс (цикл процессов) денатурации, отжига праймера и его удлинения повторяется 20-40 раз. В результате происходит экспоненциальное увеличение копий изучаемой ДНК. За 25 амплификационных циклов количество целевых последовательностей ДНК увеличивается приблизительно в 10^6 раз. Для синтеза новых цепей ДНК используются термостабильные ДНК-полимеразы (*Therminus aqmticus* или *Taq*-полимераза, *Pfu*-ДНК-полимераза, *Vent*™-ДНК-полимераза). В н. вр. ПЦР нашла широкое распространение в молекулярной биологии и на ее основе разработано множество методов анализа геномов. Имеет место также инвертированная полимеразная цепная реакция, т. е, модификация обычной ПЦР, позволяющая амплифицировать неизвестные последовательности ДНК, прилежащие к коровой области известной последовательности.

Полимеразная цепная реакция с произвольными принтерами (*arbitrarily primedpolymerase chain reaction, AP-PCR*) — модификация стандартного метода ПЦР, позволяющая осуществлять амплификацию (см.) целевых последовательностей ДНК с помощью произвольно взятых праймеров (см.), без предварительного знания нукле-отидных последовательностей данного ге-нома. Метод позволяет выявлять полиморфизм между штаммами бактерий и грибов, различными сортами растений.

Tag-полимераза, ДНК-п. (*Tag polymerase of Tag DNA p. or Thermits aqmiicus DNAp*). — см. *Thermus aquaticus* ДНК-полимераза.

***Thermus aguaticus* ДНК-полимераза** (*Thermus aguaticus DNA polymerase*) — фермент из термофильной эубактерии *Thermus aquaticus* (штамм *YT1* или *BM),* осуществляющий полимеризацию дезоксинукле-отидов и не проявляющий или почти не проявляющий З'-5'- и 5'-З'-экзонукле-азной активности (см. Экзонуклеаза). Фермент исключительно термостабилен (оптимум температуры 70-75 °С) и обеспечивает выборочную амплификацию (см.) любой клонированной ДНК до 10 млн. раз с высокой точностью методом т. н. поли-меразной цепной реакции (см.; ПЦР). Может использоваться для мечения фрагментов ДНК с помощью радиоактивных нуклеотидов, а также биотина (см.) или дигоксигенина.

Отжиг (*annealing*) — процесс восстановления (ренатурация), называемый также гибридизацией, нуклеиновой кислоты, во время которого одноцепочечные полинуклеотиды образуют двухцепочечную молекулу с водородной связью между комплементарными нуклеотидами двух цепей. О. может происходить между комплементарными цепочками ДНК или РНК, в результате образуются гибридные двухцепочечные молекулы. Название обусловлено тем, что процесс О. связан с первоначальным нагреванием образца и последующим его охлаждением.

Бластомера (*blastomere)* — дробящиеся клетки, образующиеся при митотических делениях яйцеклетки, которые обладают потенциями, реализуемыми в процессе развития. Чтобы подчеркнуть различия в размерах Б., пользуются терминами "макромера" и "микромера". Б, не растут, поэтому уменьшаются В размерах при последовательных делениях.

Бластула (*blastula or vesicular germ or bladder germ)* — зародыш многоклеточных животных, образующийся в процессе последовательных дроблений яйца, от типа которых зависит строение Б. Общность структур Б. у всех типов многоклеточных животных подтверждает единство их происхождения.

ЗАНЯТИЕ 1

ТЕМА: основы молекулярной генетики

<u>ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ:</u> Ознакомиться с составом ДНК и РНК, процессами репликации, транскрипции и трансляции на примере решения типовых задач

1. Теоретическая часть

Молекулярная генетика исследует процессы, связанные с наследственностью на молекулярном уровне. Единицей генетической или наследственной информации является ген. **Ген** – это участок молекулы **дезоксирибонуклеиновой кислоты** (**ДНК**), несущей информацию об одной полипептидной цепи.

Молекула ДНК – полимер, состоящий из двух цепочек **нуклеотидов**. Каждый нуклеотид состоит из азотистого основания, моносахарида дезоксиорибозы и остатка фосфорной кислоты. Азотистые основания в ДНК бывают четырёх типов: аденин (**А**), тимин (**Т**), гуанин (**Г**) и цитозин (**Ц**). Вдоль нити ДНК азотистые основания прочно связаны между собой через моносахарид и остаток фосфорной кислоты, между цепочками – через водородные связи. В общей схеме ДНК напоминает лестницу.

Вся «лестница» ДНК закручена в спираль. Между двумя цепочками азотистые основания располагаются закономерно: аденин всегда против тимина, гуанин – против цитозина. Иными словами, аденин комплементарен тимину, гуанин – цитозину.

Молекулы ДНК обладают способностью к удвоению (**репликации**). В основе процесса удвоения лежит **принцип комплементарности**.

Количественное соотношение нуклеотидов в молекуле ДНК известны в виде **правил Чаргаффа**:

1. ΣА = ΣТ или ΣА / ΣТ = 1
2. ΣГ = ΣЦ или ΣГ / ΣЦ = 1
3. Σ(А + Г) = Σ(Т + Ц) или Σ(А + Г) / Σ(Т + Ц) = 1
4. Количество комплементарных оснований А + Т и Г + Ц у разных видов живых организмов различно. Отношение Σ(Г + Ц) / Σ(А + Т) является важнейшей характеристикой ДНК, как показатель спецефичности её нуклеотидного состава.

Коэффициент специфичности у **ДНК** варьирует от 0,45 до 2,57 у микроорганизмов, от 0,58 до 0,94 у высших растений и от 0,54 до 0,81 у животных.

Информация о структуре белков записана и хранится в ДНК в виде определённой последовательности нуклеотидов. Расшифровка кода осуществляется с помощью **рибонуклеиновых кислот** (**РНК**). Процесс расшифровки начинается с синтеза **информационной РНК** (**и-РНК**). Информационная РНК – полимер, состоящий из одной цепочки нуклеотидов. В состав нуклеотидов также входят азотистые основания, моносахарид рибоза и остаток фосфорной кислоты. Азотистых оснований в РНК также четыре: аденин, урацил (**У**), гуанин, цитозин.

Информационная РНК по принципу комплементарности снимает информацию с ДНК. Этот процесс называется **транскрипцией** (рис 1.).

ДНК	Т – Г – Г – Т – А – Т
	А – Ц – Ц – А – Т –А
и-РНК	У – Г – Г – У – А – У

Рис. 1. Схема строения ДНК и транскрипции и-РНК.

Следующий этап расшифровки кода происходит в **рибосомах**, где осуществляется синтез полипептидной цепи белков по матрице и-РНК. Этот процесс называется **трансляцией**. В этом процессе участвуют **транспортные РНК (т-РНК)**, функция которых состоит в том, чтобы доставить аминокислоты к рибосомам и найти им своё место в полипептидной цепи, предусмотренное кодом.

Таблица 1. Соответствие кодонов и-РНК аминокислотам

Основания кодонов					
первое	второе	третье			
		У	Ц	А	Г
У	У Ц А Г	Фен Сер Тир Цис	Фен Сер Тир Цис	Лей Сер – –	Лей Сер – Три
Ц	У Ц А Г	Лей Про Гис Арг	Лей Про Гис Арг	Лей Про Глн Арг	Лей Про Глн Арг
А	У Ц А Г	Иле Тре Асн Сер	Иле Тре Асн Сер	Иле Тре Лиз Арг	Мет Тре Лиз Арг
Г	У Ц А Г	Вал Ала Асп Гли	Вал Ала Асп Гли	Вал Ала Глу Гли	Вал Ала Глу Гли

Примечание: Сокращенные названия аминокислот даны по международной терминологии. Обозначения аминокислот: Ала - аланин, Арг - аргинин, Асп - аспарагиновая кислота, Асн - аспарагин, Вал - валин, Гис - гистидин, Гли - глицин, Глн - глутамин, Глу - глутаминовая кислота, Иле - изолейцин, Лей - лейцин, Лиз - лизин, Мет - метионин, Про - пролин, Сер - серин, Тир - тирозин. Тре - треонин, Три - триптофан, Фен - фенилаланин, Цис -цистеин.

Генетический код в настоящее время расшифрован для всех 20 аминокислот и составлен по и-РНК в виде таблицы 1.

Генетический код триплетен, т.е. каждую аминокислоту кодируют три рядом стоящие нуклеотида (**кодон**). Триплеты УАА, УАГ и УГА являются **стоп-кодонами**.

Гентический **код вырожден**, т.е. каждая аминокислота шифруется более чем одним кодоном.

В данной части пособия рассматриваются задачи на выяснение состава нуклеиновых кислот, на знание принципа комплементарности при репликации ДНК и транскрипции и-РНК, на расшифровку структуры белка по известным данным о строении ДНК и обратный анализ с помощью таблицы кодирования аминокислот (табл. 1.). При решении задач по молекулярной генетике необходимо помнить, что в таблице 1 приведены кодоны для и-РНК.

2. Ключевые слова и понятия

молекулярная генетика **ген**	**информационная РНК (и-РНК)** **транскрипция**

дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) **молекула ДНК** **нуклеотид** **репликация** **принцип комплементарности** **правила Чаргаффа** **рибонуклеиновая кислота (РНК)**	**рибосома** **трансляция** **транспортная РНК (т-РНК)** **генетический код** **триплет** **кодон** **стоп-кодон** **вырожденность кода**

3. Примеры решения задач

3.1. Участок одной из цепей ДНК имеет следующую последовательность нуклеотидов: ГААГЦАТАЦ... Определите последовательность нуклеотидов во второй цепи.

Решение:

Согласно принципу комплементарности (А–Т, Г–Ц) последовательность нуклеотидов во второй цепи ДНК будет следующей:

Г А А Г Ц А Т А Ц - первая цепочка ДНК

Ц Т Т Ц Г Т А Т Г - вторая цепочка ДНК.

3.2. Укажите последовательность нуклеотидов участка молекулы и-РНК, которая образовалась на участке гена с последовательностью нуклеотидов: ЦТГГЦТТАГЦЦГ...

Решение:

Образование информационной РНК идет по тому же механизму, что и самокопирование ДНК: к цитозину присоединяется гуанин, к гуанину – цитозин, к тимину – аденин, однако к аденину ДНК присоединяется не тимин, а урацил РНК. Таким образом, для решения задачи достаточно произвести замену нуклеотидов по схеме:

Ц → Г, Г → Ц, А → У, Т → А.

В результате получим:

Ц Т Г Г Ц Т Т А Г Ц Ц Г - цепочка ДНК

Г А Ц Ц Г А А У Ц Г Г Ц - молекула и-РНК

3.3. Фрагмент молекулы ДНК, кодирующий часть полипептида, имеет следующее строение: АТАГТЦЦААГГА.

Определите последовательность аминокислот в полипептиде.

Решение:

Известна одна цепь ДНК, с которой снимается и-РНК. Строим и-РНК по условиям задачи: УАУЦАГГУУЦЦУ. Разбиваем ее на триплеты: УАУ, ЦАГ, ГУУ, ЦЦУ. По таблице генетического кода (см. табл. 1) последовательно находим для каждого триплета соответствующую аминокислоту и строим участок искомого полипептида: –тирозин – глутамин – валин – пролин –. Итак:

АТА ГТЦ ЦАА ГГА - цепочка ДНК

УАУ - ЦАГ- ГУУ - ЦЦУ - триплеты и-РНК

Тир - Глн - Вал - Про - полипептид.

3.4. Часть молекулы белка имеет такую последовательность аминокислот: – аланин – тирозин – лейцин – аспарагин –. Какие т-РНК (с какими антикодонами) участвуют в синтезе этого белка?

Решение:

По таблице генетического кода находим кодоны и-РНК: ГЦУ, УАУ, ЦУУ и ААУ. Антикодоны т-РНК будут комплементарны кодонам и-РНК: ЦГА, АУА, ГАА и УУА. Таким образом:

ГЦУ, УАУ, ЦУУ, ААУ - кодоны и-РНК

ЦГА, АУА, ГАА, УУА - антикодоны т-РНК.

3.5. Как изменится структура белка, если из участка гена – АЦАТТТАААГТЦ удалить второй и 10-й слева нуклеотиды?

Решение:

Первоначально строим и-РНК УГУАААУУУЦАГ, а затем, разбив ее на триплеты, строим участок искомого белка в норме: цистеин – лизин – фенилаланин – глутамин. По условиям задачи из цепи ДНК удаляется второй и десятый (слева) нуклеотиды. Остается ААТТТАААТЦ. По полученному участку строим цепь и-РНК УУАААУУУАГ, вновь разбив ее на триплеты, находим строение участка белка после произошедших изменений в ДНК: лейцин – аспарагин – лейцин.

До замены: АЦА ТТТ ААА ГТЦ - ДНК

УГУ - ААА - УУУ - ЦАГ - и-РНК

Цис - Лиз - Фен - Глн - белок

После замены: АА Т ТТА ААТ Ц - ДНК

УУА - ААУ - УУА - Г - и-РНК

Лей - Асн - Лей - белок

Сравнивая строение участка белка до и после изменений в ДНК, видим, что произошла замена всех аминокислот, а длина цепи сократилась на одну аминокислоту.

3.6. Полипептид состоит из следующих аминокислот: лизин – валин – серин – глутаминовая кислота.

Определите структуру участка ДНК, кодирующего указанный полипептид.

Решение:

Дана последовательность аминокислот в полипептиде. По этим сведениям нетрудно установить строение и-РНК, которая управляла синтезом данного полипептида. По таблице генетического кода находим структуру триплета для лизина (ААА), валина (ГУУ), серина (УЦУ) и глутаминовой кислоты (ГАА). Подобрав кодирующие триплеты,

составляем и-РНК для данного полипептида: АААГ УУУЦУГАА. По цепочке и-РНК можно восстановить участок цепи ДНК, с которой она снималась. Урацил вставал против аденина ДНК, гуанин – против цитозина и т.д. Следовательно, участок интересующей нас цепи ДНК будет иметь следующее строение:

ТТТЦАААГАЦТТ

Но ДНК состоит из двух цепочек. Зная строение одной цепи, по принципу комплементарности достраиваем вторую. Целиком участок двухцепочечной ДНК, кодирующий данный полипептид, будет иметь следующее строение:

Т Т Т Ц А А А Г А Ц Т Т
А А А Г Т Т Т Ц Т Г А А

4. Задачи для самоконтроля

4.1. Фрагмент одной цепи ДНК имеет следующий состав:

– А–А–А–Т–Т–Ц–Ц–Г–Г–Г– . Достройте вторую цепь.

4.2. Одна из цепочек молекулы ДНК имеет такую последовательность нуклеотидов: ТЦГАТТТАЦГ...

Какую последовательность нуклеотидов имеет вторая цепочка той же молекулы?

4.3. Укажите порядок нуклеотидов в цепочке ДНК, образующейся путем самокопирования цепочки: ААТЦГЦТГАТ...

4.4. Напишите последовательность нуклеотидов ДНК дополнительно к следующей: ТАГГЦТААТАГЦ.

4.5. Участок цепи молекулы ДНК имеет такую последовательность нуклеотидов: АТЦАТАГЦЦГ. Какое строение будет иметь двухцепочечный участок молекулы ДНК?

4.6. Одна из цепей ДНК с последовательностью нуклеотидов АТТГЦТЦАА используется в качестве матрицы для синтеза и-РНК. Какую последовательность нуклеотидов будет иметь и-РНК?

4.7. Выпишите последовательность оснований в и-РНК, образованной на цепи ДНК с такой последовательностью: ТТЦГАГТАЦЦАТ

4.8. Определите последовательность нуклеотидов участка молекулы и-РНК, которая образовалась на участке гена с последовательностью нуклеотидов: ЦАЦГАТЦЦТТЦТ.

4.9. Фрагмент одной из цепей ДНК имеет следующую последовательность нуклеотидов АААГАТЦАЦТАТТЦТГТТАЦТА. Напишите строение молекулы и-РНК, образующейся в процессе транскрипции на этом участке молекулы ДНК.

4.10. Образовавшийся участок молекулы и-РНК имеет следующий состав кодонов: ГЦГ-АЦА-УУУ-УЦГ-ЦГУ-АГУ-АГА-АУУ. Определите,

какие коды ДНК будут кодировать эту и-РНК и в какой последовательности они будут располагаться?

4.11. Определите аминокислотный состав полипептида, который кодируется и-РНК следующего состава: ЦЦУ – ЦЦЦ – ЦЦА – ЦЦГ.

4.12. Участок молекулы и-РНК имеет следующее строение:

АГУАГАУУЦУУУ

В каком порядке расположатся аминокислоты в соответствующем участке белка, синтезируемого на этой РНК как на матрице?

4.13. Участок гена, кодирующего белок, состоит из последовательно расположенных нуклеотидов: ААЦГАЦТАТЦАЦТАТАЦЦААЦГАА. Определите состав и последовательность аминокислот в полипептидной цепи, закодированной в этом участке гена.

4.14. Участок гена, кодирующего одну из полипептидных цепей гемоглобина состоит из кодов следующего состава: ГАЦЦАТГАА. Определите состав и последовательность аминокислот в полипептидной цепи.

4.15. В систему для искусственного синтеза белка ввели т-РНК, имеющие антикодоны: ЦГА, УУА, АЦА, ЦЦА. Определите, какие аминокислоты смогут участвовать в биосинтезе белка?

4.16. Фрагмент молекулы адренокортикотропного гормона человека, вырабатываемого передней долей гипофиза, имеет структуру: – серин – тирозин – серин – метионин –. Определите перечень антикодонов в т-РНК, участвующих в биосинтезе фрагмента АКТГ.

4.17. Часть молекулы белка имеет такую последовательность аминокислот: – лизин – треонин – глицин – валин – аргинин –. Какие т-РНК (с какими антикодонами) участвуют в синтезе этого белка?

4.18. Участок гена имеет следующее строение: ЦГЦТЦААААТЦГ...

Укажите строение соответствующего участка того белка, информация о котором содержится в данном гене. Как отразится на строении белка удаление из гена первого нуклеотида?

4.19. Определите порядок следования друг за другом аминокислот в участке молекулы белка, если известно, что он кодируется такой последовательностью нуклеотидов ДНК: ТГЦГТТТАТГЦГ...

Как изменится ответ, если химическим путем из молекулы ДНК будет удален шестой нуклеотид?

4.20. Назовите последовательные мономеры участка молекулы белка, который синтезируется на основе информации, “записанной” в молекуле ДНК таким порядком нуклеотидов: ЦЦЦАААААГАТА...

Как отразится на строении белка удаление из молекулы ДНК второго нуклеотида?

4.21. Какая последовательность аминокислот кодируется такой последовательностью нуклеотидов ДНК: АГТГТГААЦЦАГ...
и какой станет последовательность аминокислот, если между третьим и четвертым нуклеотидами вставить тимин?

4.22. С какой последовательности аминокислот начинается белок, если он закодирован такой последовательностью нуклеотидов:

ЦЦЦАТГГЦЦГГТ...

А каким станет начало цепочки аминокислот синтезируемого белка, если под влиянием облучения четвертый нуклеотид окажется выбитым из молекулы ДНК?

4.23. Участок цепи белка вируса табачной мозаики состоит из следующих аминокислот: – серин – глицин – серин – изолейцин – треонин – пролин – серин –. В результате воздействия на и-РНК азотистой кислотой цитозин РНК превращается в гуанин.

Определите изменения в строении белка вируса после воздействия на и-РНК азотистой кислотой.

4.24. Какими последовательностями нуклеотидов информационной РНК кодируется следующая последовательность аминокислот белка: – треонин – триптофан – тирозин – валин –?

4.25. Используя таблицу генетического кода (см. табл. 1), напишите участок ДНК, в котором закодирована информация о следующей последовательности аминокислот в белке: – аргинин – триптофан – тирозин – гистидин – фенилаланин –.

4.26. Начало цепи одного гистона имеет следующую аминокислотную последовательность: – аланин – аргинин – треонин – лизин –. Какова возможная структура начальных фрагментов и-РНК и двухцепочной ДНК?

4.27. Первые 10 аминокислот в цепи В инсулина: фенилаланин – валин – аспарагиновая кислота – глутамин – гистидин – лейцин – цистеин – глицин – серин – гистидин –.

Определите структуру участка ДНК, кодирующего эту часть цепи инсулина.

4.28. Начальный участок цепи А инсулина представлен следующими пятью аминокислотами: – глицин – изолейцин – валин – глутамин – глутамин –. Определите структуру участка ДНК, кодирующего эту часть цепи инсулина.

4.29. Какой последовательностью нуклеотидов ДНК кодируется участок белка, если он имеет следующее строение: – аргинин – пролин – лейцин – валин – аргинин – ?

5. Литература

1. **Айала Ф., Кайгер Дж.** Современная генетика: Пер. с англ.: В 3 т. – М.: Мир, 1988., ил.
2. **Кочергин Б.Н., Кочергина Н.А.** Задачи по молекулярной биологии и генетике. Мн.: Народная асвета, 1982. – 80 с.
3. **Соколовская Б.Х.** Сто задач по генетике и молекулярной биологии. – Новосибирск: Наука, 1971.
4. **Жимулев И.Ф**. Общая и молекулярная генетика: Учеб. пособие. – Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та: Сиб. унив. изд-во, 2002. – 459 с., ил.
5. **Картель Н.А**. Биоинженерия: методы и возможности. Мн.: Ураджай, 1989.- 143 с., ил.
6. **Методы молекулярной генетики и генной инженерии**/ Мазин А.В. и др. – Новосибирск: Наука. 1990. – 248 с.
7. **Песецкая Л.Н., Гончаренко Г.Г.** Сборник задач по генетике. Гомель: ГГУ, 2002. – 114с.
8. **Уотсон Дж., Туз Дж., Курц Д.** Рекомбинантные ДНК. Краткий курс: Пер. с англ.- М.: Мир, 1986.- 288 с., ил.
9. **Льюин Б.** Гены: – Пер. с англ. – М.: Мир, 1987. – 544 с., ил.
10. **Modern genetic analysis.** Griffiths et al. – Freeman and company. New York. 1999. – 675 p.
11. **Principles of genetics.** Snustad P., Simmons M. / Second edition – John Wiley & Sons. New York. 1999. – 876 p.
12. **An introduction to genetic analysis.** Griffiths et al. – Freeman and company. New York. 2000. – 730 p.

ЗАНЯТИЕ 2

ТЕМА: ферменты рестрикции и получение гибридной ДНК

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Ознакомиться с ферментами рестрикции и способами получения гибридной ДНК от различных организмов, освоить методы гибридизации ДНК на примере решения типовых задач

2. Теоретическая часть

Для того чтобы искусственным путем наделить какой-либо организм новыми наследственными свойствами, нужно ввести в него новый ген или несколько генов от другого организма. Причем нужно, чтобы эти гены в чужом организме начали "работать" – производить белки.

Осуществляется эта процедура с помощью двух операций "разрезания" и "сшивания". Роль портняжных инструментов играют **ферменты рестриктазы** и **лигазы**.

Рестриктазы (своеобразные молекулярные ножницы), действуя на двухцепочечную ДНК, "узнают" в ней определенную последовательность нуклеотидов. Причем, каждая рестриктаза узнает только свою последовательность ДНК, прикрепляется к ней и разрезает ее в месте прикрепления. Рестриктазам безразлично, чью ДНК разрезать – человека или растения, бактерии или вируса, лишь бы в ней были **распознаваемые участки**. Это значит, что две совершенно несхожих между собой последовательности ДНК (допустим из клеток слона и лягушки) при обработке одной и той же рестриктазой легко можно сшить (слепить) друг с другом. Обычно рестриктазы распознают в молекулах ДНК очень короткие, но строго специфичные для каждого фермента участки длиной в 4 – 6 пар нуклеотидов и разрезают обе цепи ДНК посередине этих участков или с некоторым смещением. В первом случае образуются обрывки с **ровными (тупыми) концами**, а во втором – стороны разрезаемых цепочек ДНК заходят одна за другую. Такие одноцепочечные концы называются "липкими", поскольку они могут как бы слипаться между собой в силу комплементарности.

Ярким примером рестриктазы второго типа является **EcoRI**, которая узнает фрагмент ДНК из шести нуклеотидов ГААТТЦ, и режет эту последовательность ДНК ассиметрично, «ступенькой» между нуклеотидами Г и А (рис. 1). В результате место разреза в одной цепи смещено по отношению к другой на 4 пары оснований. При таком разрезе

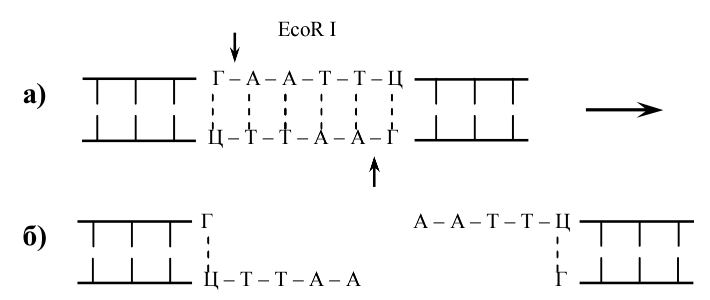


Рис. 1. **а)** схема действия фермента рестриктазы EcoR I на двухцепочечную молекулу ДНК, с указанием участка распознавания и места разреза; **б)** фрагменты ДНК с липкими концами после разрезания

образуется два выступающих конца. Эти концы притягиваются друг к другу, желая восстановить свои старые связи и скрепиться, как им и положено, водородными мостиками.

Если с той же EcoR1 получить фрагменты ДНК из различных организмов, то все они будут иметь одинаковые, подходящие друг к другу "**липкие концы**". Скрепить выступающие липкие концы двух молекул ДНК помогает другой фермент - **ДНК-лигаза**. Он лигирует, то есть "сшивает" между собой сахарофосфатные остовы двух фрагментов с образованием полной структуры двойной спирали ДНК. Внешне она ничем не

Таблица 1. Некоторые рестриктазы и расщепляемые ими последовательности.

Рестриктазы	Участки распознования и места разреза ДНК
Bam I	5`-Г-Г-А-Т-Ц-Ц-3` 3`-Ц-Ц-Т-А-Г-Г-5`
EcoR I	5`-Г-А-А-Т-Т-Ц-3` 3`-Ц-Т-Т-А-А-Г-5`
Hind III	5`-А-А-Г-Ц-Т-Т-3` 3`-Т-Т-Ц-Г-А-А-5`
Hae III	5`-Г-Г-Ц-Ц-3` 3`-Ц-Ц-Г-Г-5`
Hpa II	5`-Ц-Ц-Г-Г-3` 3`-Г-Г-Ц-Ц-5`

Sma I	5`-Ц-Ц-Ц˅-Г-Г-Г-3` 3`-Г-Г-Г-˄Ц-Ц-Ц-5`

отличается от обычной ДНК. Сейчас в арсенале генных инженеров имеется более 500 различных рестриктаз, способных разрезать ДНК примерно в 120 различных местах. Несколько рестриктаз и участки ДНК, которые они могут разрезать, представлены в таблице 1.

С помощью этих и некоторых других ферментов многие исследователи начали конструировать и конструируют в настоящее время разнообразные по своим составным частям **гибридные (рекомбинантные) ДНК**.

2. Ключевые слова и понятия

ферменты рестрикции **рестриктазы** **распознаваемые участки** **липкие концы** **ровные (тупые) концы**	*EcoRI* ***Sma I*** **ДНК-лигаза** **гибридные (рекомбинантные) ДНК** **конструирование ДНК**

3. Примеры решения задач

3.1. Имеется последовательность из 39 нуклеотидных пар двухцепочечной ДНК следующего состава:

5`-ЦЦТТАГГЦЦТГААТТААГГЦААТАГТГТГААТТЦАЦАТГ-3`
3`-ГГААТЦЦГГАЦТТААТТЦЦГТТАТЦАЦАЦТТААГТГТАЦ-5`

Каким способом и на сколько частей можно разрезать эту ДНК?

Решение:

В данной последовательности ДНК имеется два участка распознавания: ГААТТЦ для рестриктазы EcoR I и ГГЦЦ для Hae III (см. таблицу 1). Поэтому искомая ДНК может быть разрезана в двух местах с образованием трёх различных фрагментов следующих последовательностей:

1) 5`-ЦЦТТАГГ-
3`-ГГААТЦЦ-

2) -ЦЦТГААТТААГГЦААТАГТГТГ-
-ГГАЦТТААТТЦЦГТТАТЦАЦАЦТТАА-

3) -ААТТЦАЦАТГ-3`
-ГТГТАЦ-5`

3.2. Рестрикционный фермент Hind III разрезает ДНК по последовательности ААГЦТТ. Насколько часто этот фермент будет разрезать двухцепочечную ДНК? (Иными словами, какова средняя длина фрагментов разрезанной ДНК?).

Решение:

Нам необходимо рассмотреть только одну цепочку ДНК, поскольку обе цепочки имеют одинаковые, симметричные последовательности, хотя и разнонаправленные. Частота встречаемости фрагмента из 6 нуклеотидных пар для Hind III составит $(1/4)^6 = 1/4096$, так как вероятность для одного нуклеотида (допустим А) занять конкретное место в цепочке ДНК составляет ¼, а таких мест имеется 6. Следовательно, среднее расстояние между участками разрезания рестриктазой Hind III составит около 4 тысяч нуклеотидных пар (4 тысячи баз или 4 килобазы).

3.3. Гаплоидный геном человека содержит около 3×10^9 нуклеотидных пар (н.п.) ДНК. Если вы порежете человеческую ДНК рестикционным ферментом EcoRI, узнающим гексамерную последовательность ГААТТЦ, то сколько различных рестрикционных фрагментов будет получено?

Решение:

Исходя из предположения, что четыре нуклеотида А, Т, Г, Ц находятся в равных количествах и распределяются в ДНК случайным образом, вероятность для любого из четырех нуклеотидов занять конкретное место в цепочке составляет ¼. Вероятность для двух нуклеотидов (например, АГ) занять конкретное место составит ¼ × ¼ = $(1/4)^2$, а вероятность для специфической гексамерной последовательности будет равна $(1/4)^6 = 1/4096$. Следовательно, EcoRI будет разрезать молекулу человеческой ДНК в среднем один раз на 4096 нуклеотидных пар. Если молекула ДНК разрежется n раз, то в результате получается n+1 фрагмент. Гаплоидный геном из 3×10^9 нуклеотидных пар содержит около 732 422 ($3 \times 10^9/4096$) мест разреза для рестриктазы EcoRI. Если бы полный геном человеческой ДНК состоял из одной молекулы, то EcoRI могла бы разрезать его на 732 422 + 1 фрагмент. Но поскольку места разрезания распределены по 23 хромосомам, то в результате полного

расщепления человеческой ДНК рестриктазой EcoRI должно получится 732422 + 23 рестрикционных фрагмента.

3.4. Ниже приведены последовательности двух фрагментов ДНК, выделенных из организмов разных видов.

1) 5`-АГЦАТАЦТГТГААТТЦАЦА-3`
3`-ТЦГТАТГАЦАЦТТААГТГТ-5`

2) 5`-АТГААТТЦТТАГЦАТАЦ-3`
3`-ТАЦТТААГААТЦГТАТГ-5`

С помощью каких ферментов можно получить гибридную молекулу ДНК из этих фрагментов? Опишите последовательные этапы получения гибридной молекулы.

Решение:

На первом этапе необходимо разрезать представленные фрагменты ДНК разных видов с помощью подходящих рестрикционных ферментов. В данном случае можно использовать рестриктазу EcoRI, которая расщепит ДНК двух видов на четыре новых фрагмента 1а, 1б и 2а, 2б с липкими концами ААТТ и ТТАА:

1а) 5`-АГЦАТАЦТГТГ
3`-ТЦГТАТГАЦАЦТТАА

1б) ААТТЦАЦА-3`
ГТГТ-5`

2а) 5`-АТГ
3`-ТАЦТТАА

2б) ААТТЦТТАГЦАТАЦ-3`
ГААТЦГТАТГ-5`

В ходе второго этапа необходимо смешать нужные нам фрагменты 1а и 2б. В результате выступающие липкие концы скрепятся между собой, как им и положено, водородными связями в силу комплементарности.

5`-АГЦАТАЦТГТГ А-А-Т-Т-ЦТТАГЦАТАЦ-3`
3`-ТЦГТАТГАЦАЦ-Т-Т-А-А ГААТЦГТАТГ-5`

Окончательное скрепление фрагментов 1а и 2б двух молекул ДНК производит специализированный фермент ДНК-лигаза, которая “сшивает“ между собой сахарофосфатные остовы обоих фрагментов с образованием полной структуры двойной спирали ДНК.

4. Задачи для самоконтроля

4.1. Имеется последовательность из 27 нуклеотидных пар двухцепочечной ДНК следующего состава:

5`- ЦТГААТТАГГАТЦЦАГГЦААТАГТГТГ -3`
3`-ГАЦТТААТЦЦТАГГТЦЦГТТАТЦАЦАЦ-5`

Каким способом и на сколько частей можно разрезать эту ДНК?

4.2. Имеется последовательность из 24 нуклеотидных пар двухцепочечной ДНК следующего состава:

5`-ТЦАГААТГЦТГГЦЦААГТАЦТТАГ-3`
3`-АГТЦТТАЦГАЦЦГГТТЦАТГААТЦ-5`

Каким способом и на сколько частей можно разрезать эту ДНК?

4.3. Ниже приведены две последовательности одноцепочечных молекул ДНК. Какую из них в двухцепочечной форме могут разрезать известные вам рестриктазы?

а) 5`-АЦТЦЦАГААТТЦАЦТЦЦГ-3`

б) 5`-ГЦЦТЦАТТЦГААГЦЦТГА-3`

4.4. Ниже приведены три последовательности одноцепочечных молекул ДНК. Какую из них в двухцепочечной форме могут разрезать известные вам рестриктазы?

а) 5`-ТАГГЦТААГЦТТАЦЦГАТ-3`

б) 5`-ЦГААТАТТТЦЦГГАТГАА-3`

в) 5`-АГГТЦЦТТАТЦЦГАТААТТ-3`

4.5. Рестрикционный фермент Hpa II разрезает ДНК по последовательности ЦЦГГ. Какова средняя длина фрагментов разрезанной ДНК?

4.6. Рестрикционный фермент EcoRI разрезает ДНК по последовательности ГААТТЦ. Насколько часто этот фермент будет разрезать двухцепочечную ДНК?

4.7. Если последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК распределяется случайным образом, то какова будет средняя длина фрагмента при разрезании ДНК рестриктазами, узнающими последовательность из восьми нуклеотидов?

4.8. Гаплоидный геном человека содержит около 3×10^9 нуклеотидных пар ДНК. Сколько различных рестрикционных фрагментов будет получено при разрезании человеческой ДНК рестрикционным ферментом Not I, узнающим октамерную последовательность ГЦГГЦЦГЦ?

4.9. Сколько различных рестрикционных фрагментов будет получено при разрезании человеческой ДНК рестикционным ферментом Sma I?

4.10. Гаплоидный геном дрожжевого грибка *Saccharomyces cerevisiae,* состоящий из одной хромосомы, содержит около $13,5 \times 10^6$ нуклеотидных пар ДНК. Если вы порежете эту ДНК ферментом EcoRI, то сколько различных рестрикционных фрагментов будет получено?

4.11. Гаплоидный геном *Saccharomyces cerevisiae* ($13,5 \times 10^6$ н. п.) разрезали ферментом HaeIII. Сколько различных рестрикционных фрагментов будет получено?

4.12. Геном кишечной палочки *Escherichia coli*, представляющий собой одну кольцевую хромосому, содержит около $4,7 \times 10^6$ н. п. Его

разрезали ферментом HaeIII. Сколько различных рестрикционных фрагментов будет получено?

4.13. Геном *Drosophila melanogaster,* состоящий из четырёх хромосом, содержит около 10^8 нуклеотидных пар ДНК. Если вы порежете эту ДНК ферментом EcoRI, то сколько различных рестрикционных фрагментов будет получено?

4.14. Ниже приведены последовательности двух фрагментов ДНК, выделенных из организмов разных видов.

5`-АААГЦТТЦТГААТЦЦГАТЦГ-3`
3`-ТТТЦГААГАЦТТАГГЦТАГЦ-5`

5`-ГТАЦТЦАГАТЦЦТАГГАТААГЦТТА-3`
3`-ЦАТГАГТЦТАГГАТЦЦТАТТЦГААТ-5`

С помощью каких ферментов можно получить гибридную молекулу ДНК из этих фрагментов? Опишите последовательные этапы получения гибридной молекулы.

4.15. Опишите последовательные этапы получения гибридной ДНК из представленных ниже фрагментов.

5`-ТАЦТАТЦЦГГАГТАГГАТЦЦТ-3`
3`-АТГАТАГГЦЦТЦАТЦЦТАГГА-5`

5`-ЦГГАТЦЦТАГАТТЦЦАТА-3`
3`-ГЦЦТАГГАТЦТААГГТАТ-5`

5. Литература

1. **Айала Ф., Кайгер Дж.** Современная генетика: Пер. с англ.: В 3 т. - М.: Мир, 1988., ил.
2. **Жимулев И.Ф**. Общая и молекулярная генетика: Учеб. пособие. – Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та: Сиб. унив. изд-во, 2002. – 459 с., ил.
3. **Картель Н.А**. Биоинженерия: методы и возможности.- Мн.: Ураджай, 1989.- 143 с., ил.
4. **Методы молекулярной генетики и генной инженерии**/ Мазин А.В. и др. – Новосибирск: Наука. 1990. – 248 с.
5. **Песецкая Л.Н., Гончаренко Г.Г.** Сборник задач по генетике. Гомель: ГГУ, 2002. – 114с.
6. **Рыбчин В.Н.** Основы генетической инженерии: Учеб. пособие для вузов.- Мн.: Выш. шк., 1986.- 186 с.: ил.
7. **Уотсон Дж., Туз Дж., Курц Д.** Рекомбинантные ДНК. Краткий курс: Пер. с англ.- М.: Мир, 1986.- 288 с., ил.
8. **Щелкунов С.Н.** Конструирование гибридных молекул ДНК.- Новосибирск: Наука, 1987.- 168 с.
9. **Льюин Б.** Гены: - Пер. с англ.- М.: Мир, 1987.- 544 с., ил.
10. **Modern genetic analysis/** Griffiths et al. – Freeman and company. New York. 1999. – 675 p.

11. **Principles of genetics.** Snustad P., Simmons M. / Second edition – John Wiley & Sons. New York. 1999. – 876 p.
12. **An introduction to genetic analysis.** Griffiths et al. – Freeman and company. New York. 2000. – 730 p.

ЗАНЯТИЕ 3

ТЕМА: анализ и использование фрагментов ДНК (ДНКовых последовательностей)

<u>ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ:</u> Ознакомиться с методами электрофоретического анализа ДНК в агарозном геле и методом блот-гибридизации ДНК по Саузерну на примере решения типовых задач

1. Теоретическая часть

При помощи набора **ферментов рестрикции** исследователи научились получать **фрагменты ДНК** разных размеров практически из любых видов. В ходе **манипуляций с различными фрагментами ДНК** часто необходимо определить размер или выделить конкретный участок ДНК из смеси. Оказалось, что фрагменты ДНК легче всего разделять с помощью метода **электрофореза в агарозном геле**. ДНК, обработанную одной или несколькими рестриктазами, помещают в лунки застывшего агарозного геля, который помещается в специальную **камеру для электрофореза** (рис. 1). В камере создается электрическое поле, под действием которого фрагменты ДНК начинают перемещаться в пористом, похожем на мармелад геле. **Скорость продвижения** фрагментов ДНК в геле зависит от их длины. Короткие фрагменты движутся быстрее, чем длинные. Это позволяет цепочкам ДНК разной длины отделиться друг от друга. При этом фрагменты ДНК не повреждаются и их можно **выделить из геля** без всяких повреждений и потери биологических свойств.

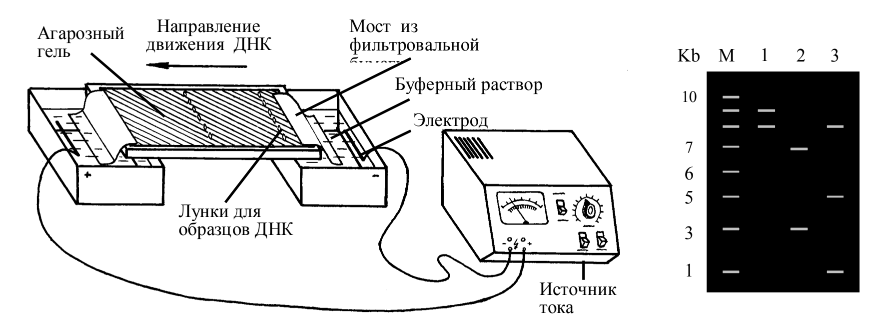


Рис. 1. Схематическое изображение камеры для электрофореза ДНК в агарозном геле. Справа представлена электрофореграмма фрагментов ДНК, окрашенная этидиум бромидом и помещенная под УФ свет. (М – маркеры, 1,2,3 – образцы одной и той же ДНК, разрезанные различными рестриктазами).

Если после электрофореза окрасить гель специальным **красителем этидиум бромидом,** связывающимся с ДНК и поместить гель под ультрафиолетовый свет, то на нем будут хорошо видны окрашенные в красный цвет, расположенные на различном расстоянии друг от друга **светящиеся фракции ДНК.** Каждая такая фракция соответствует одному фрагменту ДНК. Следует подчеркнуть, что разные рестриктазы дают разную картину расщепления одной и той же ДНК (электрофореграмма на рис. 1 справа). Таким образом, электрофорез в агарозном геле позволяет **разделить**, а затем **легко извлечь** любые рестрикционные фрагменты ДНК в чистом виде, для последующего использования. Кроме того, анализируя электрофоретические **спектры ДНК на геле**, наблюдая за исчезновением одних и появлением других фракций под действием разных рестриктаз, исследователи начали составлять **генетические рестрикционные карты** расположения участков ДНК для разных видов. Первую полную физическую карту расположения участков 14 рестриктаз составил Д. Натанс для ДНК вируса SV-40.

В 1975 году был разработан метод, который позволяет **идентифицировать** конкретные **гены и** другие **рестрикционные фрагменты ДНК** после их электрофоретического разделения. Суть

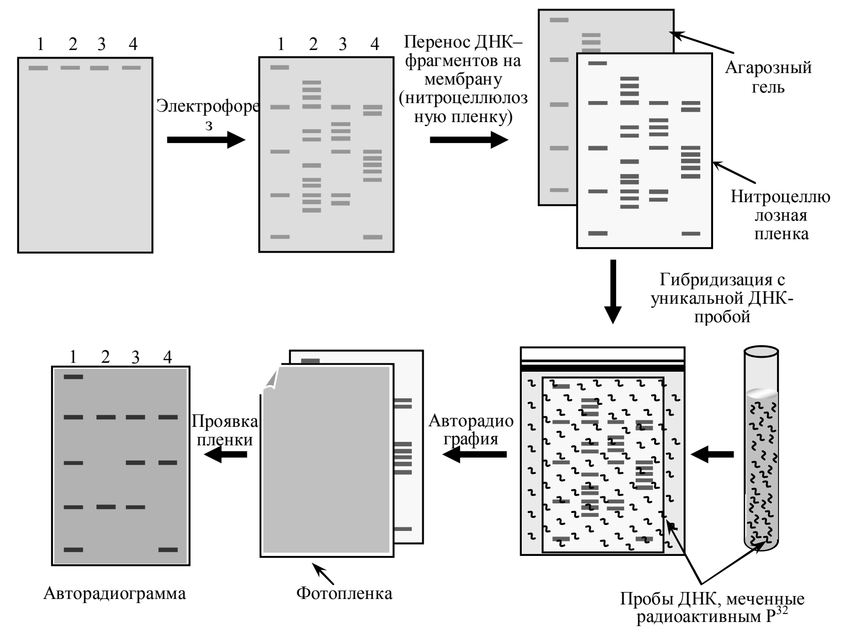


Рис. 2. Схематическое изображение основных этапов Саузерн-блот гибридизации.

метода заключается в том, что сначала фрагменты ДНК, разделенные в агарозном геле, **денатурируются до одноцепочечных** молекул, а затем весь электрофоретический спектр ДНК **отпечатывается (blotting)** за счет капиллярных сил на приложенной к гелю **нитроцеллюлозной мембране (пленке**), после чего фиксируется при помощи высокой температуры (рис. 2). Далее мембрана помещается в гибридизационный буфер, содержащий **специальный радиоактивно меченый ДНКовый зонд** – короткую специфическую последовательность ДНК. **Зонд** способен гибридизоваться с определенным комплементарным фрагментом ДНК и свяжется только с одной или несколькими конкретными фракциями из всего электрофоретического спектра полученных рестрикционных фрагментов ДНК. На последнем этапе к нитроцеллюлозной мембране, содержащей весь спектр полученных фрагментов ДНК, включая **фракции, гибридизовавшиеся с радиоактивно меченым зондом,** прикладывают рентгеновскую пленку. На пленке (**авторадиограмме)** после экспозиции выявляются засвеченные места, соответствующие расположению меченых фракций ДНК. Это метод получил название **Саузерн-блот гибридизации** в честь разработавшего его Эдварда Саузерна.

К настоящему времени удалось практически полностью расшифровать (прочитать) абсолютное большинство генов даже у таких сложных видов как человек и дрозофила. Для этих и многих других видов получено огромное количество различных **ДНКовых зондов (проб),** которые успешно используются в **Саузерн-блот анализе**.

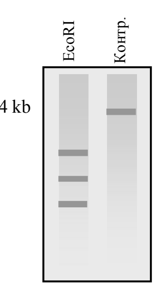
2. Ключевые слова и понятия

ферменты рестрикции **фрагменты ДНК** **манипуляции с фрагментами ДНК** **электрофорез в агарозном геле** **электрофоретическая камера** **скорость продвижения фрагментов** **краситель этидиум бромид** **разделение рестрикционных фрагментов ДНК** **выделение рестрикционных фрагментов ДНК из геля** **светящиеся фракции ДНК** **рестрикционные карты**	**идентификация генов и рестрикционных фрагментов ДНК** **денатурация ДНК** **blotting** **нитроцеллюлозная мембрана** **радиоактивно меченый ДНКовый зонд** **Саузерн-блот гибридизация** **ДНК пробы** **фракции гибридизовавшиеся с радиоактивно меченым зондом** **авторадиограмма** **Саузерн-блот анализ**.

3. Примеры решения задач

3.1. Фрагмент человеческой ДНК длиной 4 тысячи нуклеотидных пар имеет два сайта рестрикции для фермента EcoRI. Как будет выглядеть

электрофореграмма, окрашенная этидиум бромидом, после электрофореза в агарозном геле образца данной ДНК, разрезанной этой рестриктазой на неровные части?



Решение:

После электрофореза в агарозном геле образец данной ДНК, разрезанный рестриктазой EcoRI по двум сайтам рестрикции на электрофореграмме, окрашенной этидиум бромидом, будет представлен тремя фракциями различной подвижности. Схематическое изображение электрофореграммы одного из возможных вариантов спектра показано на рисунке справа. Поскольку исходный фрагмент был размером 4 кб, то естественно, все три фрагмента будут меньшей величины.

3.2. Молекула ДНК величиной 17 кб была разрезана на фрагменты двумя рестриктазами. Результаты электрофоретического анализа в агарозном геле, полученных фрагментов ДНК после окраски этидиум бромидом представлены на фореграмме рис. 3. При разрезании рестриктазой № 1 ДНК разрезается на три фракции величиной 8, 6 и 3 кб, а при разрезании рестриктазой № 2 на две фракции – 10 и 7 кб. ДНК, разрезанная сразу двумя рестриктазами № 1 и № 2, состоит из четырёх фракций величиной 8, 6, 2 и 1 кб.

В каком порядке полученные рестрикционные фрагменты расположены в исходной молекуле ДНК величиной 17 кб? Иными словами, необходимо построить рестрикционную карту ДНК 17кб.

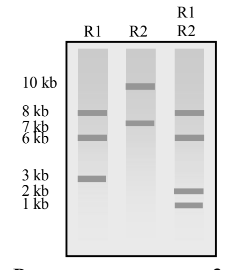


Рис. 3. Электрофореграмма ДНК-фрагмен-тов (R1 и R2 - рестриктазы)

Решение:

В этом упрощённом примере исходная молекула ДНК величиной 17 кб разрезается на три фракции ферментом № 1 в двух местах, т.е. имеется два сайта рестрикции для рестриктазы № 1. Однако неясно, в середине или с краю исходной ДНК расположен фрагмент величиной 3 кб. Совместное разрезание ферментами № 1 и № 2 оставляет нетронутыми фракции длиной 8 и 6 кб, но разрезает фрагмент 3 кб на две части длиной 2 и 1 кб, что указывает на наличие сайта рестрикции для рестриктазы № 2 в пределах фрагмента рестриктазы № 1. Если бы фрагмент 3 кб был на краю исходной молекулы 17 кб, использование только фермента № 2 позволило бы получить фрагменты 2 кб и 1 кб. Но так как этого не произошло, то из трёх рестрикционных фрагментов, полученных при помощи фермента №1, фрагмент длиной 3 кб должен быть расположен в середине.

Таким образом, рестрикционная карта исходной ДНК для рестриктазы № 1 (R1) и рестриктазы № 2 (R2) будет иметь вид, представленный на рис. 4.

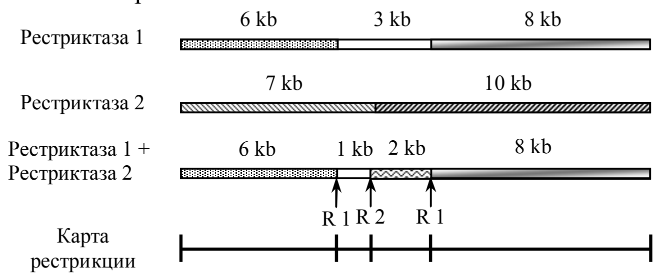


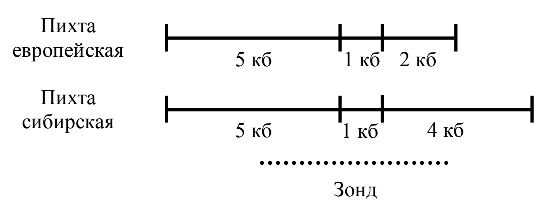
Рис. 4. Рестрикционная карта, построенная на основе анализа электрофоретического фракционирования фрагментов ДНК, полученных в результате действия двух различных рестриктаз и их смеси на нативную ДНК.

Тот факт, что сайт R2 расположен ближе к участку длиной 6 кб, следует из величины участков в 7 и 10 кб, полученных при разрезании исходной ДНК только рестриктазой № 2.

3.3. Исследователям удалось выделить специальный зонд, способный гибридизоваться с участком хлоропластной ДНК (хлДНК) у любых видов хвойных. Авторадиограмма образцов хлоропластной ДНК родительских видов пихт европейской (Е) и сибирской (С), обработанных рестрикционным ферментом и результаты последующей Саузерн-блот гибридизации с использованием радиоактивного зонда представлены на рисунке справа. Каковы будут рестрикционные карты у родительских видов пихт?

Решение:

Исходя из данных, представленных на авторадиограмме, величина одного из фрагментов ДНК, которые гибридизуются со специальным зондом у деревьев пихты сибирской будет длиннее на 2 кб. Рестрикционные карты двух видов пихт будут иметь следующий вид:



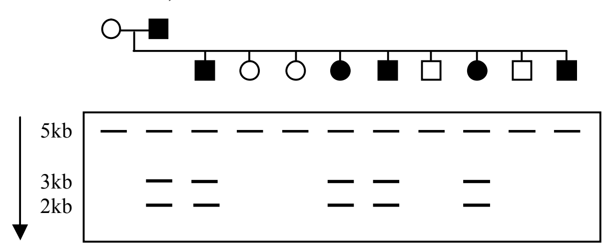
3.4. При скрещивании между деревьями пихты европейской и пихты

сибирской было получено 20 потомков. Каковы будут их рестрикционные спектры на авторадиограмме после Саузерн-блот гибридизации с хлоропластным зондом в случае, когда материнскими деревьями служила пихта европейская, а пыльца бралась от пихты сибирской и наоборот?

Решение:

Так как хлоропласты у голосеменных всегда наследуются по отцовской линии, то у гибридов F_1(♀C×♂E) спектр на авторадиограмме будет аналогичный спектру пихты европейской. При реципрокном скрещивании у гибридов F_1(♀E×♂C) на авторадиограмме спектр рестрикционных фрагментов будет аналогичный таковому у пихты сибирской.

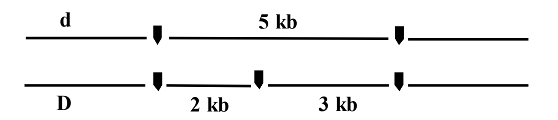
3.5. Анализ ДНК был проведен в большой семье, среди членов которой наблюдалось доминантное аутосомное заболевание, проявляющееся в 40 лет и позже. Образцы ДНК каждого члена семьи обработали рестрикционным ферментом TagI и полученные фрагменты ДНК разделили при помощи электрофореза в агарозном геле. Затем провели Саузерн-блот гибридизацию с использованием радиоактивной пробы, состоящей из фрагмента клонированной ДНК человека. Родословная исследованной семьи и полученная авторадиограмма электрофорезированной ДНК представлены на рисунке ниже. Черным отмечены члены семьи, имеющие заболевание.



Проанализируйте полные взаимоотношения между полученными с помощью радиоактивной пробы спектрами ДНК членов семьи и геном болезни. Нарисуйте соответствующие хромосомные участки родителей.

Решение:

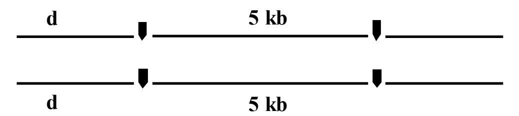
Использованные радиоактивные ДНК-пробы позволили выявить на авторадиограмме три фракции ДНК размером 5, 3 и 2 кб. Все члены семьи имеют 5-кб фрагмент. У пяти из шести членов семьи, имеющих заболевание, присутствуют 3 и 2-кб ДНК-фрагменты, тогда как у здоровых они отсутствуют. Следовательно, эти два фрагмента, вероятно,



сцеплены в цисположении с аллелем, несущим заболевание. Поскольку фрагменты 3 и 2 добавляются к 5-кб фрагменту, вероятное построение отцовских хромосом является следующим:

где D – аллель, определяющий заболевание, а стрелками отмечены сайты для рестрикционного фермента TagI.

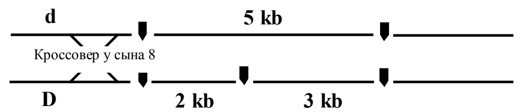
Соответственно строение материнских хромосом будет иметь следующий вид:



3.6. Используя схему авторадиограммы из предыдущей задачи, ответьте каким образом можно объяснить спектр последнего сына?

Решение:

Последний сын наиболее вероятно представляет кроссовер между локусом несущим заболевание и маркерным локусом, произошедшим в результате кроссинговера в хромосоме с D и 5-кб фрагментами.



3.7. Мутация, вызывающая болезнь – серповидно-клеточная анемия (СКА), обусловлена заменой всего одного нуклеотида в ДНК β-глобинового гена. Причем, в результате этой мутации пропадает сайт рестрикции для фермента MstII, который присутствует в нормальном гене. Как можно использовать эту информацию для консультации семей, проживающих в районах высокой концентрации этой мутации, на предмет **выявления носителей** данного наследственного заболевания? Какие молекулярно-генетические эксперименты для этого необходимо провести?

Решение:

Мутацию β-глобинового гена, приводящую к заболеванию можно достаточно легко выявлять, используя молекулярно-генетические методы. Для этого необходимо индивидуальные образцы ДНК обработать рестриктазой MstII. Затем, полученные рестрикционные фрагменты подверг-нуть электрофоретическому фракционированию в агарозном геле с последующей Саузерн-блот гибридизацией, используя в качестве зонда меченый фрагмент β-глобиновой ДНК.

Поскольку в результате мутационной замены нуклеотида в ДНК β-глобинового гена происходит потеря сайта рестрикции для MstII, который присутствует в нормальном гене, то на авторадиограмме (рис. 5)

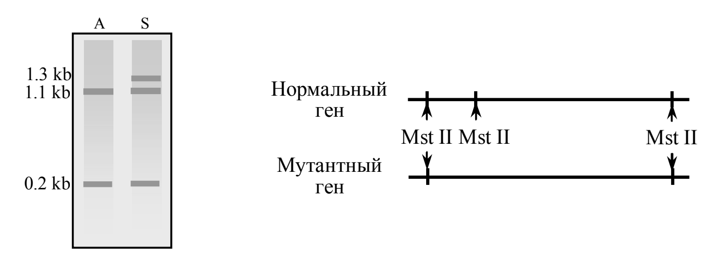


Рис. 5. Авторадиограмма и рестрикционные карты, построенные на основе анализа электрофоретического фракционирования фрагментов ДНК β-глобинового гена, полученных в результате действия рестриктазы Mst II.

образцов, взятых у здоровых людей будут присутствовать две фракции (размером 1.1 и 0.2 кб), тогда как в образцах, взятых у людей страдающих серповидно-клеточной анемией, будет присутствовать дополнительная «тяжелая» (неразрезанная) фракция ДНК (величиной 1.3 кб).

Таким образом, для консультации семей, проживающих в районах высокой концентрации мутации, вызывающей серповидно-клеточную анемию, наиболее целесообразно использовать молекулярно-генетические методы, включающие рестрикционный и Саузерн-блот анализ, которые дают возможность достаточно легко выявлять носителей данного заболевания.

4. Задачи для самоконтроля

4.1. Фрагмент человеческой ДНК длинной 2 тысячи нуклеотидных пар (2 килобазы) имеет один сайт рестрикции для фермента EcoRI.

Сколько фракций ДНК будет присутствовать на фореграмме, окрашенной этидиум бромидом, после электрофореза в агарозном геле образца этой ДНК, обработанной EcoRI?

4.2. Фрагмент мышиной ДНК длиной 8 тысяч нуклеотидных пар имеет два сайта рестрикции для фермента BamI.

Как будет выглядеть электрофореграмма, окрашенная этидиум бромидом, после электрофореза в агарозном геле образца этой ДНК, разрезанной этой рестриктазой на неровные части?

4.3. Кольцевая молекула митохондриальной ДНК (мтДНК) имеет один сайт рестрикции для рестриктазы EcoRI.

Сколько фракций ДНК будет присутствовать на фореграмме после электрофореза в агарозном геле образца этой ДНК, обработанной EcoRI?

4.4. Фрагмент бактериальной ДНК длиной 5 килобаз имеет один сайт рестрикции для фермента EcoRI и два сайта для BamI.

Как будет выглядеть электрофореграмма после электрофореза в агарозном геле образца этой ДНК обработанной только EcoRI, только BamI, а также смесью этих двух рестриктаз?

4.5. Линейный фрагмент ДНК разрезается ферментами HindIII и SmaI, а затем двумя ферментами вместе. В результате проведенного электрофореза в агарозном геле с последующим окрашиванием этидиум бромидом на электрофорегарамме получена картина, представленная на рис. 6.

Необходимо построить рестрикционную карту для исходной молекулы ДНК.

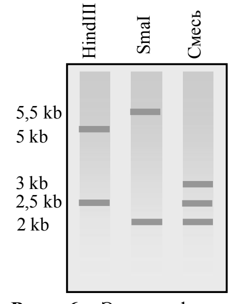


Рис. 6. Электрофореграмма фрагментов ДНК.

4.6. Полученную выше смесь рестрикционных фрагментов ДНК обработали еще одним ферментом – EcoR I, при этом в спектре исчезла фракция 3 кб, но появилась новая – величиной 1.5 кб. Какой вид будет иметь рестрикционная карта в этом случае?

4.7. Кольцевая молекула митохондриальной ДНК (мтДНК) разрезана двумя рестрикционными ферментами А и Б. Электрофореграмма полученных ферментов, окрашенных этидиум бромидом, представлена на рис. 7.

Построить схематичную рестрикционную карту этих фрагментов.

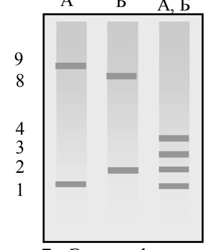
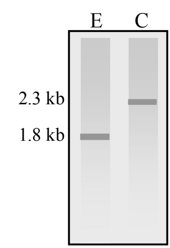


Рис. 7. Электрофореграмма фрагментов мтДНК.

4.8. Имеется последовательность очищенной молекулы ДНК. После обработки этой ДНК ферментом EcoRI получены фрагменты 1, 2, 3 и 4. Каждый из четырёх фрагментов был разрезан HidIII. В результате фрагмент 3 разрезался на два субфрагмента 3_1 и 3_2, а фрагмент 2 распался на 2_1, 2_2 и 2_3.

После обработки исходной целой ДНК ферментом HindIII получено четыре фрагмента А, Б, В и Г. Когда каждый из этих фрагментов обработали EcoRI, то фрагмент Г разрезался на фрагменты 1 и 3_1, А расщепился на 3_2 и 2_1 и Б разрезался на 2_3 и 4. Фрагмент В оказался идентичным с 2_2. Нарисовать рестрикционную карту исходной ДНК.

4.9. Исследователям удалось выделить специальный зонд, способный гибридизоваться с участком митохондриальной ДНК (мтДНК) у любых видов хвойных. Авторадиограмма образцов мтДНК родительских видов пихт европейской (Е) и сибирской (С), обработанных рестрикционным ферментом и результаты последующей Саузерн-блот



гибридизации с использованием радиоактивного зонда представлены на рисунке справа**.** При скрещивании между деревьями пихты европейской и пихты сибирской было получено 20 потомков.

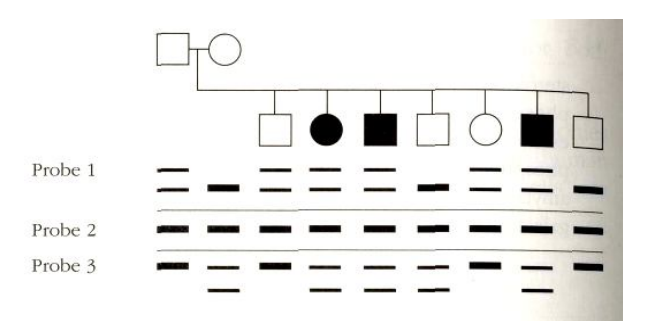
Каковы будут их спектры на авторадиограмме после Саузерн-блот гибридизации с митохондриальным зондом в случае, когда материнскими деревьями служила пихта европейская, а пыльца бралась от пихты сибирской и при обратном скрещивании?

4.10. Мутация, вызывающая болезнь циклический фиброз (ЦФ), обусловлена заменой всего одного нуклеотида. Причем, в результате этой мутации пропадает сайт рестрикции для EcoRI, который присутствует в норме. Как можно использовать эту информацию для консультации семьи на предмет того являются ли они носителями данного наследственного заболевания? Какие молекулярно-генетические эксперименты для этого необходимо провести?

4.11. В ходе проведенного молекулярно-генетического анализа с использованием специального ДНК-зонда на циклический фиброз и Саузерн-блот гибридизации было установлено, что женщина в семье из задачи 4.10 является носителем этого заболевания. Она вышла замуж за неродственного мужчину, являющегося также гетерозиготой по ЦФ, но он является носителем другой мутации в этом же гене.

Оцените риск рождения у этой семейной пары детей, страдающих циклическим фиброзом.

4.12. Супружеская пара имеет 3х детей больных циклическим фиброзом (ЦФ). Их старший сын женился на своей троюродной сестре.



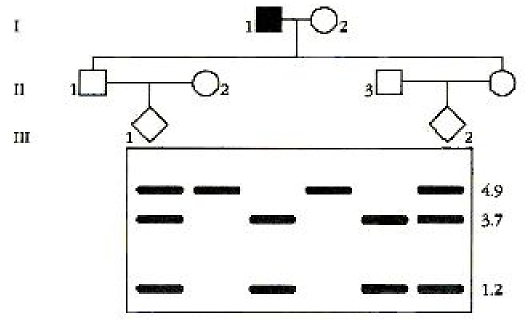
Он провел молекулярное тестирование с целью установить вероятность заболевания циклическим фиброзом своих детей. Три специальных ДНКовых зонда тесно сцепленных с геном, определяющим заболевание фиброзом, были использованы для молекулярного анализа генотипов у членов его семьи. Полученная авторадиограмма электрофорезированной ДНК у членов исследованной семьи представлена на рисунке ниже.

Является ли старший сын в этой семье нормальной гомозиготой или носителем заболевания?

4.13. Исходя из представленной авторадиограммы электрофорезированной ДНК у членов исследованной семьи из предыдущей задачи, определите являются ли нормальными гомозиготами или носителями два его нормальных брата и сестра.

4.14. Используя представленную в задаче 4.12 авторадиограмму укажите, кто из родителей в этой семье является носителем аллеля несущего заболевание циклический фиброз?

4.15. Мужчина, страдающий доминантным наследственным заболеванием, болезнью Хантингтона имеет двоих взрослых детей. Его дети опасаясь, что могут оказаться носителями наследственного заболевания, решили провести молекулярно-генетическую диагностику родителей, а также супругов и эмбрионов своих будущих детей. В то же



время, сами от такой диагностики отказались. Саузерн-блот анализ выявил двухаллельную систему (с аллельными фрагментами в 4.9 кб или 3.7 и 1.2 кб) по ДНК-маркеру, который показывает 4 процента рекомбинантов с болезнью Хантингтона. Родословная этой семьи с результатами проведенного Саузерн-блот анализа представлена ниже. Для каждого из двух проанализированных эмбриональных образцов, вычислите шанс, что зародыши унаследуют аллель, сцепленный с болезнью Хантингтона.

5. Задачи повышенной сложности

5.1. Болезнь Хантингтона (БХ) является аутосомно-доминантным заболеванием, при котором происходит нейродегенеративное расстройство, приводящее к летальному исходу. Поскольку четкие симптомы этой болезни начинают проявляться только в возрасте около 40

лет, потенциальные больные к этому сроку обычно уже имеют детей, часть из которых наследует это заболевание. Установить диагноз болезни Хантингтона в возрасте до 40 лет раньше не представлялось возможным. Однако в последние годы ученые сумели найти и сконструировать специальный ДНК-зонд (G8), позволяющий выявлять полиморфизм (тетраморфизм) ДНК, связанный с болезнью Хантингтона. Зонд G8 и четыре типа фрагментов ДНК, которые он позволяет определить посредством Саузерн-блот гибридизации, представлены на рисунке 8.

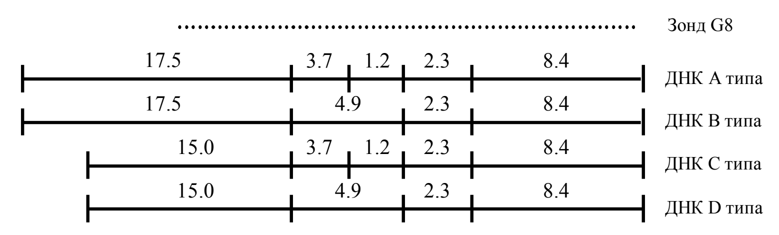


Рис. 8. Рестрикционные карты (для HindIII) четырех типов ДНК, способных гибридизоваться с зондом G8.

Каковыми будут электрофоретические спектры рестрикционных фрагментов ДНК, обработанных HindIII, после Саузерн-блот гибридизации у людей, имеющих гомозиготные AA, BB, CC, DD и гетерозиготные AB, AC, AD, BC, BD и CD генотипы? Все ли они будут различаться между собой?

5.2. На рисунке 9 представлена родословная семи поколений членов венесуэльской семьи, в которой распространена болезнь Хантингтона. Члены семьи были обследованы на предмет выявления генотипов (см. задачу 5.1) четырехаллельной системы фрагментов ДНК, гибридизующихся с зондом G8. Результаты обследования показаны на родословной, где черным цветом показаны члены семьи, страдающие БХ,

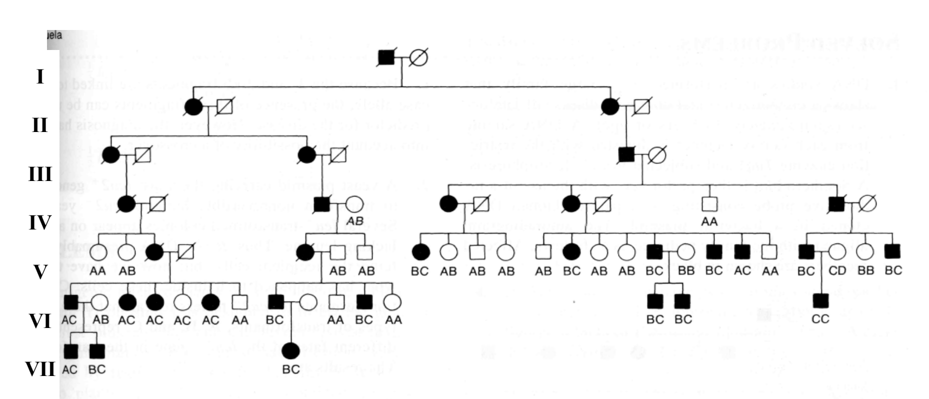


Рис. 9. Родословная венесуэльской семьи с болезнью Хантингтона. Черным цветом показаны члены семьи, страдающие БХ, значки членов семьи, не доживших до обследования, зачеркнуты.

а значки членов семьи, не доживших до обследования, зачеркнуты.

Какие выводы можно сделать, анализируя эту родословную на предмет связи типов ДНК, гибридизующихся с G8 и болезнью Хантингтона. Иными словами, с какими генотипами и аллелями ДНК-маркера связана болезнь Хантингтона в этой семье?

5.3. Каким образом можно объяснить наличие генотипа AC у здоровой женщины в шестом поколении (VI-5) венесуэльской семьи, представленной на рисунке 9?

5.4. Исходя из приведенных выше данных по венесуэльской семье (рис. 9), что можно сказать о степени сцепления ДНК-маркера с геном, обуславливающим болезнь Хантингтона.

5.5. Как могут приведенные в предыдущих задачах данные помочь в выявлении механизмов, обуславливающих первопричины болезни Хантингтона?

6. Литература

13. **Айала Ф., Кайгер Дж.** Современная генетика: Пер. с англ.: В 3 т. - М.: Мир, 1988. , ил.
14. **Жимулев И.Ф**. Общая и молекулярная генетика: Учеб. пособие. – Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та: Сиб. унив. изд-во, 2002. – 459 с., ил.
15. **Картель Н.А**. Биоинженерия: методы и возможности.- Мн.: Ураджай, 1989.- 143 с., ил.
16. **Методы молекулярной генетики и генной инженерии**/ Мазин А.В. и др. – Новосибирск: Наука. 1990. – 248 с.
17. **Песецкая Л.Н., Гончаренко Г.Г.** Сборник задач по генетике. Гомель: ГГУ, 2002. – 114с.
18. **Рыбчин В.Н.** Основы генетической инженерии: Учеб. пособие для вузов.- Мн.: Выш. шк., 1986.- 186 с.: ил.
19. **Уотсон Дж., Туз Дж., Курц Д.** Рекомбинантные ДНК. Краткий курс: Пер. с англ.- М.: Мир, 1986.- 288 с., ил.
20. **Щелкунов С.Н.** Конструирование гибридных молекул ДНК.- Новосибирск: Наука, 1987.- 168 с.
21. **Льюин Б.** Гены: - Пер. с англ.- М.: Мир, 1987.- 544 с., ил.
22. **Modern genetic analysis/** Griffiths et al. – Freeman and company. New York. 1999. – 675 p.
23. **Principles of genetics.** Snustad P., Simmons M. / Second edition – John Wiley & Sons. New York. 1999. – 876 p.
24. **An introduction to genetic analysis.** Griffiths et al. – Freeman and company. New York. 2000. – 730 p.

ЗАНЯТИЕ 4

ТЕМА: плазмидные вектора – специальные устройства для доставки и клонирования чужеродных генов

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Ознакомиться с простейшими векторами, сконструированными на основе плазмид, освоить методы введения и клонирования чужеродных ДНК с помощью плазмидных векторов на примере решения типовых задач

1. Теоретическая часть

С помощью ферментов **рестриктаз** и **лигаз** исследователи научились конструировать разнообразные по своим составным частям **гибридные (рекомбинантные) ДНК,** путём сшивки фрагментов разных видов *in vitro*.

Но как полученным гибридным генам попасть в клетку и начать там работать?

Для доставки чужеродных генов в различные организмы учёные стали применять специальные устройства, так называемые вектора. **Вектор** – это молекула ДНК, способная **самостоятельно реплицироваться** в клетках различных организмов и **обеспечивать размножение** (**клонирование**) и работу (**экспрессию**) встроенного в неё искусственно какого-либо гена. В английской литературе вектор часто обозначается словом vehicle – повозка.

Идеальными векторными молекулами, созданными самой природой, оказались **плазмиды**, представляющие собой небольшие **кольцевые молекулы ДНК**, самостоятельно живущие в цитоплазме бактерий. Плазмиды способны к автономной репликации, обладают **генами устойчивости** к различным антибиотикам, что позволяет легко обнаружить их присутствие в клетках, плазмиды могут внедряться в хромосому клетки хозяина, а также имеют участки ДНК (**сайты рестрикции**) для действия ряда рестриктаз. Это означает, что каждая такая рестриктаза может разрезать кольцо плазмидной ДНК и переводить её в линейное состояние. После чего линейную плазмиду можно легко соединить с фрагментом ДНК другого вида с подходящими липкими концами.

Первым успешным **вектором-повозкой**, который начали использовать в генной инженерии, стала кольцевая плазмида **pSC101**. Она несет только один **участок расщепления** (**сайт рестрикции**) рестриктазой EcoR1 и превращается под действием этого фермента из кольцевой в линейную молекулу, концы которой могут «слипаться» между собой или с любыми фрагментами другой ДНК, полученными под действием той же рестриктазы. Кроме того, она несет ген устойчивости к антибиотику тетрациклину, а значит легко обнаруживается в бактериях, если их растить на среде с этим антибиотиком. Все эти свойства pSC101 и были использованы для создания и **клонирования** первых **гибридных (рекомбинантных) ДНК**, которые были бы функционально активными, то есть могли бы стабильно существовать в клетке и наделять (**трансформировать**) ее новыми признаками. Этапы введения фрагмента **чужеродной ДНК** в плазмидный вектор pSC101 с помощью рестриктазы EcoR1 схематически показаны на рис. 1.

По мере развития методов генной инженерии совершенствовались и плазмидные вектора. Широкое распространение получила **плазмида pBR322**. У нее больше участков, разрезаемых различными рестриктазами, следовательно, с ней можно «сшивать» самые разные фрагменты ДНК. Более того, у pBR322 не один, а два **маркера для селекции** на бактериальных средах: помимо тетрациклина эта плазмида кодирует еще ус-

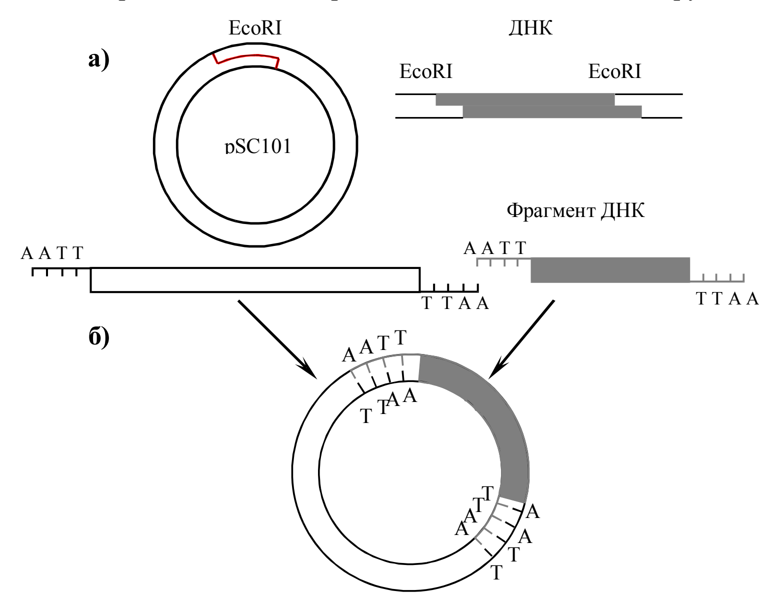


Рис. 1. Введение фрагмента рекомбинантной молекулы ДНК в плазмидный вектор pSC101 с помощью рестриктазы EcoRI, образующей «липкие» концы: **а**)—разрезание молекул ДНК рестриктазой и образование фрагментов с «липкими» концами; **б)** — гибридизация и сшивание ферментом лигазой фрагментов ДНК.

тойчивость к ампициллину (рис. 2). Если один из этих генов (например, ген устойчивости к тетрациклину) разрезать определенной рестриктазой, то при встраивании в это место фрагмента **чужеродной ДНК** целостность гена нарушается и определяемый им признак исчезает. Это позволяет легко отбирать гибридные плазмиды, **специальным образом введённые** в бактериальные клетки кишечной палочки *E. coli* при помещении их на твёрдую питательную среду с антибиотиками ампицилином и тетрациклином и на среду только с ампициллином. **Трансформированные** бактерии *E. coli,* т.е. содержащие гибридные плазмиды, растут на среде с ампицилином, но не растут на среде с двумя антибиотиками, потому что ген тетрациклиновой устойчивости в плазмиде повреждён вставкой. Селективный рост позволяет отбирать и выращивать только клетки, содержащие гибридные молекулы ДНК.

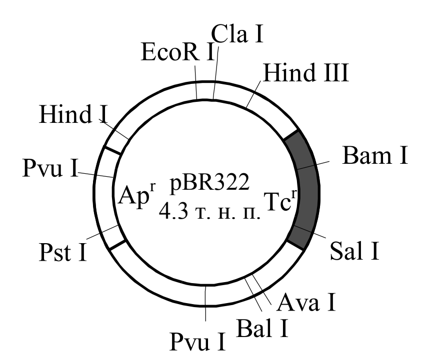
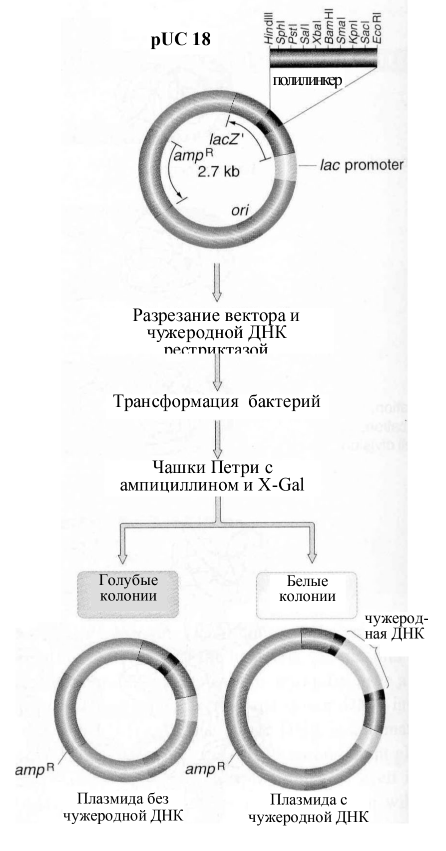


Рис. 2. Вектор pBR322, схема расположения сайтов рестрикции. Ap^r и Tc^r – гены устойчивости к ампициллину и



Многие годы успешно применяется еще один класс плазмидных векторов, относящихся к типу **pUC**. На рисунке слева представлена схема использования плазмиды **pUC18**. У этой плазмиды величиной 2,7 кб селекционным маркёром является ген резистентности к ампициллину (amp^r). Кроме того, имеется крайне интересный **ген lacZ**, в котором расположен **полилинкер** или **участок множественного**

клонирования длиной около 200 н.п., содержащий 10 сайтов рестрикции. В результате **инсерции (вставки)** чужеродной ДНК в полилинкер нарушается работа гена lacZ в плазмиде. Колонии бактерий содержащие нормальный и повреждённый вставкой гены легко различаются если поместить клетки в чашки Петри на среду содержащую **субстрат X-Gal**, который расщепляется ферментом **β-галак-тозидазой** (продукт гена lacZ), с образованием нерастворимого осадка сине-голубого цвета. Если образовались **колонии, окрашенные в синий цвет**, значит, в этих бактериальных клетках плазмиды не содержат вставки чужеродной ДНК. В тоже время бактериальные клетки, которые содержат плазмиды со встроенной ДНК, образуют неокрашенные колонии. Следовательно, достаточно лишь взглянуть на трансформированные бактериальные клетки и можно с уверенностью сказать успешно ли прошло клонирование вставленной в плазмиду pUC18 чужеродной ДНК или нет. Поэтому **гены подобные lacZ** получили название **репортерных.**

Помимо плазмид в качестве векторов стали успешно использовать **фаги** и **вирусы**. Позже были созданы **космиды** – особый тип векторов, сочетающих свойства плазмиды и фага.

Таким образом, последовательна была создана основная триада элементов техники генной инженерии: выделение генов, «сшивание» их с вектором, доставка гибридной структуры в конкретный **(реципиентный) организм**, где она сможет размножаться и наследоваться в потомстве.

2. Ключевые слова и понятия

рестриктазы и лигазы	**маркер для селекции**
вектор	**pUC18**
плазмиды	**lacZ**
кольцевые молекулы ДНК	**полилинкер**
чужеродная ДНК	**участок множественного клонирования**
самостоятельная репликация	**X-Gal**
клонирование	**β-галактозидаза**
экспрессия	**фаги**
гены устойчивости	**вирусы**
трансформация	**космиды**
участок расщепления	**реципиентный организм**
сайт рестрикции	**трансформированные организмы**
pSC101	**репортерные гены**
pBR322	

3. Примеры решения задач

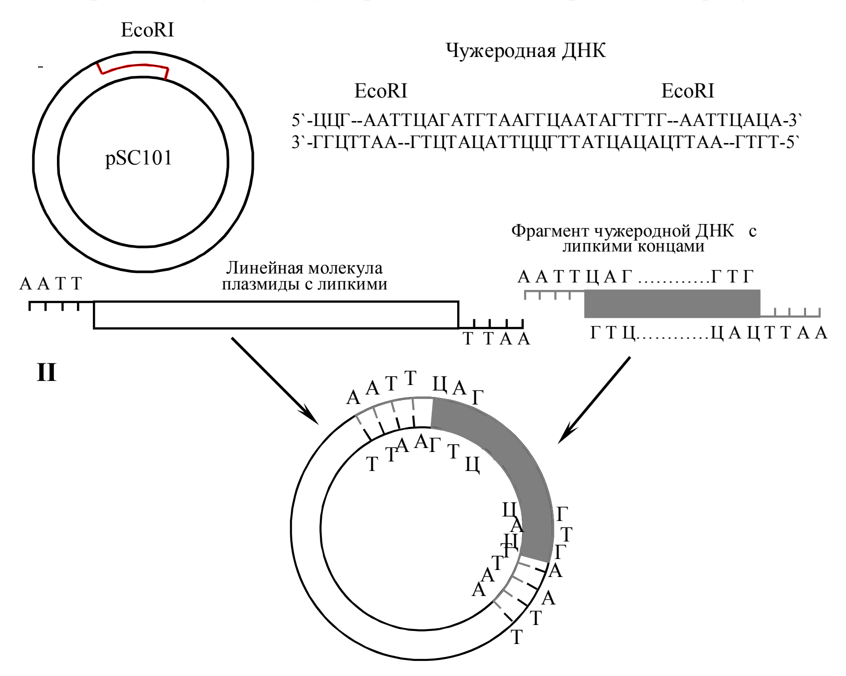
3.1. Кольцевая плазмида pSC101 несет только один участок расщепления рестриктазой EcoR1. Какой из приведённых ниже фрагментов ДНК можно встроить в данную плазмиду?

5`-ЦЦГААТТЦАГАТГТААГГЦААТАГТГТГААТТЦАЦА-3`
3`-ГГЦТТААГТЦТАЦАТТЦЦГТТАТЦАЦАЦТТААГТГТ-5`

5`-ЦЦТТАГГЦЦТГААТТААГГЦААТАГТГТГААТЦАЦАТГ-3`
3`-ГГААТЦЦГГАЦТТААТТЦЦГТТАТЦАЦАЦТТАГТГТАЦ-5`

Решение:

Поскольку плазмида pSC101 несет один участок расщепления рестриктазой EcoR1, то в неё можно встроить только тот фрагмент ДНК, который также может быть разрезан рестриктазой EcoR1. Поэтому из двух фрагментов двухцепочечной ДНК, приведённых выше, в плазмиду pSC101 можно встроить лишь первый, так как только он содержит участки разрезания для EcoR1. Схематически этапы встраивания участка чужеродной ДНК изображены на рисунке:



На первом этапе EcoR I разрезает по сайтам рестрикции плазмиду и первую молекулу ДНК с образованием фрагментов ДНК с липкими концами. На втором этапе происходит гибридизация линейной молекулы плазмиды и фрагмента чужеродной ДНК с последующим образованием

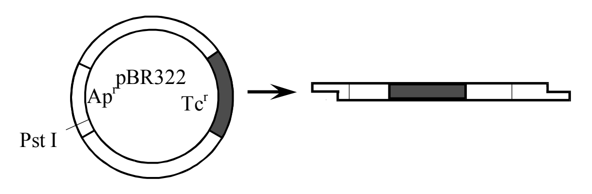
кольцевой молекулы вектора со встроенным участком чужеродной ДНК и сшивание их при помощи фермента лигазы.

3.2. При помощи рестриктазы Pst I получен фрагмент двухцепочечной ДНК с липкими концами. Можно ли встроить данный фрагмент в плазмиду pBR322? Как подтвердить, что фрагмент чужеродной ДНК встроен в плазмиду pBR322?

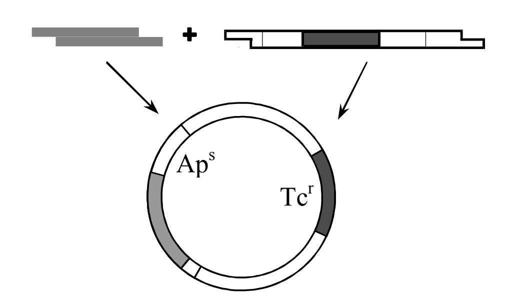
Решение:

Данный фрагмент ДНК можно встроить в плазмиду pBR322, поскольку она несет участок расщепления рестриктазой Pst I. Процесс вставки фрагмента в плазмиду аналогичен таковому в предыдущей задаче.

На первом этапе под действием рестриктазы Pst I, узнающей последовательность ЦТГЦАГ, получают линейную молекулу плазмиды с липкими концами:

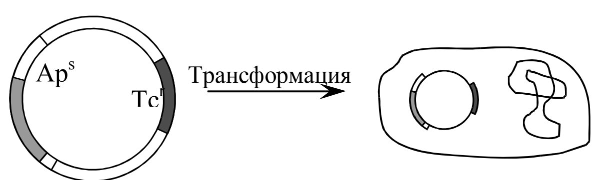


На втором этапе происходит гибридизация линейной молекулы

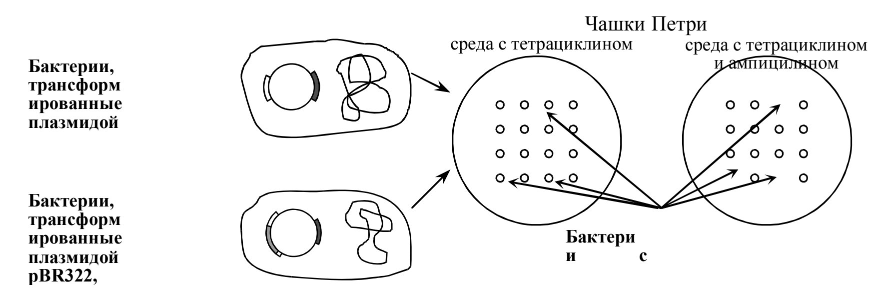


плаз-миды с фрагментом ДНК с последующим сшиванием ферментом лигазой:

Так как сайт рестрикции для Pst I находится в гене устойчивости (резистентности) к ампициллину, то при вставке чужеродной ДНК по месту разреза будет нарушена целостность гена Ap. Соответственно



исчезнет признак устойчивости к ампициллину, кодируемый данным геном. Для того, чтобы подтвердить наличие чужеродной ДНК, гибридную плазмиду вводят в бактерию.



Трансформированные плазмидой бактерии помещают на среду в чашку Петри, содержащую только тетрациклин. Затем переносят реплику (отпечаток) колоний на среду, содержащую и тетрациклин, и ампициллин.

Если бактериальные колонии растут на среде содержащей тетрациклин, но не растут на среде с двумя антибиотиками, то это означает, что данные бактерии несут плазмиды с чужеродной ДНК, встроенной в ген устойчивости к ампициллину. Иными словами, встроить данный фрагмент в плазмиду pBR322 при помощи рестриктазы Pst I удалось.

4. Задачи для самоконтроля

4.1. Ниже приведён фрагмент ДНК, можно ли встроить его в плазмиду pSC101?

5`-АГГЦЦТГААТТААГГЦААТАГТГТГААТЦА-3`
3`-ТЦЦГГАЦТТААТТЦЦГТТАТЦАЦАЦТТАГТ-5`

4.2. Ниже приведены два одноцепочечных фрагмента ДНК. Какой из них в двухцепочечном варианте можно использовать для встраивания в плазмиду pSC101?

а) 5`-ГГЦЦТГААТТЦААГЦАТАГТГТГААТТЦАА-3`

б) 5`-ТЦЦГГАЦТТААТТГТТАТЦАЦАЦТТАГТ-5`

4.3. Кольцевая плазмида pBR322 имеет участки расщепления различными рестриктазами. Какой из ниже приведённых фрагментов двухцепочечной ДНК можно встроить в данную плазмиду?

5`-ЦЦГАТТЦАГАТГТААГГЦААТАГТГТГАТТЦАЦА-3`
3`-ГГЦТААГТЦТАЦАТТЦЦГТТАТЦАЦАЦТААГТГТ-5`

5`-ЦЦТТААГЦТТАГГЦТААГГЦААТАГААГЦТТТЦААТГ-3`
3`-ГГААТТЦГААТЦЦГАТТЦЦГТТАТЦТТЦГАААГТТАЦ-5`

4.4. Какой из ниже приведённых фрагментов двухцепочечной ДНК можно встроить в плазмиду pBR322?

5`-ЦЦГААТТЦАГАТГТААГГЦААТАГТГТГААТТЦАЦА-3`
3`-ГГЦТТААГТЦТАЦАТТЦЦГТТАТЦАЦАЦТТААГТГТ-5`

5`-ЦЦТТААГЦТТАГГЦТААГГЦААТАГААГЦТТЦАЦАТГ-3`
3`-ГГААТТЦГААТЦЦГАТТЦЦГТТАТЦ ТТЦГААГТГТАЦ-5`

4.5. В плазмиде pUC18 имеется полилинкерный участок, который содержит сайты рестрикции для 10 различных рестриктаз. Можно ли встроить в эту плазмиду приведённые ниже фрагменты двухцепочечной ДНК?

5`-ЦЦГААТТЦАГАТГТААГГЦААТАГТГТГААТТЦАЦА-3`
3`-ГГЦТТААГТЦТАЦАТТЦЦГТТАТЦАЦАЦТТААГТГТ-5`

5`-ЦЦТТААГЦТТАГГЦТААГГЦААТАГААГЦТТТЦААТГ-3`
3`-ГГААТТЦГААТЦЦГАТТЦЦГТТАТЦТТЦГАААГТТАЦ-5`

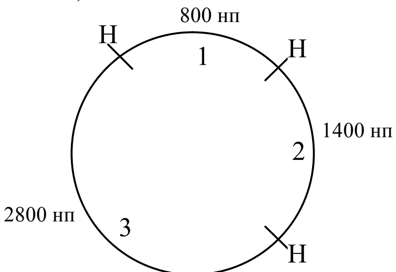
4.6. Имеется фрагмент двухцепочечной ДНК следующего состава:

5`- ТАГГАТЦЦАТТАААТАГТГГАТЦЦГТ -3`
3`-АТЦЦТАГГТААТТТАТЦАЦЦТАГГЦА-5`

Можно ли встроить данный фрагмент в плазмиду pBR322? Как подтвердить, что фрагмент чужеродной ДНК встроен в плазмиду pBR322?

4.7. В плазмиду pBR322 вставлен фрагмент чужеродной ДНК. Трансформированные такой плазмидой бактерии растут на питательной среде с ампициллином, но не растут на питательной среде, содержащей тетрациклин. Какой известной вам рестриктазой можно вырезать чужеродную ДНК из плазмиды?

4.8. Ген *Ms* находится в кольцевой плазмиде величиной 5 000 нуклеотидных пар (5 000 нп). Разрезание плазмиды рестрикционным ферментом Hind III дает фрагменты 1, 2 и 3, как показано на рисунке (H - Hind III рестрикционные сайты):



Тандемная копия гена *Ms* содержится только в одном Hind III фрагменте. Если ген *Ms* кодирует регуляторный белок MSS4, состоящий из 300 аминокислот, то укажите в каком фрагменте плазмиды расположены копии гена *Ms*?

4.9. Фрагмент ДНК мыши величиной 4 кб, имеющий на концах сайты рестрикции для EcoRI, содержит ген *M*. Этот фрагмент был встроен в плазмиду pBR322 по EcoRI сайту. Полученная рекомбинантная плазмида была разрезана двумя рестриктазами, электрофоретический спектр полученных рестрикционных фрагментов, окрашенных этидиум бромидом, представлен на рисунке 3. Для фракций на геле, полученных после разрезания сразу двумя ферментами, была проведена Саузерн-блот гибридизация с использованием в качестве зонда меченого фрагмента плазмиды pBR322.

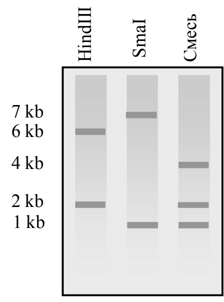
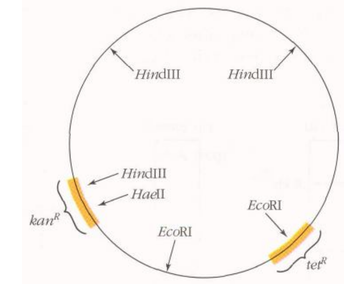


Рис. 3. Электрофореграмма фрагментов ДНК.

С какими фракциями ДНК произойдет гибридизация меченого зонда?

4.10. Ген для белка β-тубулина был получен из грибка *Neurospora*, вставлен в кольцевую плазмиду и клонирован в бактерии *E.coli*. Опишите шаг за шагом последовательность действий, необходимых для того, чтобы клонировать этот ген от родственного грибка *Podospora*, используя в качестве вектора кольцевую плазмиду pBR, представленную на рисунке справа, которая несет два гена устойчивости к антибиотикам канамицину (kan) и тетрациклину (tet).



4.11. Фрагмент человеческой ДНК величиной 6 кб был встроен в плазмиду pBR 322 по EcoRI сайту. После этого, рекомбинантная плазмида была разрезана двумя рестриктазами, а полученные образцы подвергнуты электрофорезу в агарозном геле, как и в задаче 4.9. Электрофоретический спектр полученных фрагментов представлен на рис. 4. Для фракций, полученных после разрезания сразу двумя ферментами, была проведена Саузерн-блот

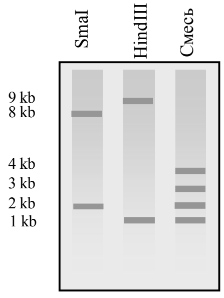


Рис. 4. Электрофореграмма фрагментов ДНК.

гибридизация с меченым зондом из плазмиды pBR322.

С какими фракциями ДНК в этом случае произойдет гибридизация меченого зонда?

4.12. Исследователи для клонирования важного фрагмента человеческой ДНК величиной 1кб использовали плазмиду pUC18. Трансформированные гибридной плазмидой клетки *E. coli* были помещены на питательную среду, содержащую X-Gal. После культивирования в чашках Петри появились колонии синего и белого цвета. Удалось ли встроить нужный фрагмент человеческой ДНК в плазмиду pUC18?

4.13. Интересный фрагмента человеческой ДНК величиной 1 кб был встроен в плазмиду pUC18 по Hind III сайту и клонирован в *E. coli.* Если выделить гибридную плазмиду и разрезать рестриктазой Hind III то как будет выглядеть спектр фрагментов после электрофореза в агарозном геле в случае когда человеческая ДНК успешно встроилась в pUC18 и когда этого не произошло?

4.14. Изменится ли электрофоретический спектр фрагментов после электрофореза в агарозном геле если, выделенную по условиям задачи 4.13 гибридную плазмиду pUC18 разрезать сразу двумя рестриктазами Hind III и EcoR1?

5. Задачи повышенной сложности

5.1. Исследователи получили трансгенные растения табака, в которые, используя в качестве вектора специализированную Ti-плазмиду, был введен нужный ген вместе с подсоединенным к нему канамицинустойчивым геном предварительно встроенные во фрагмент Т-ДНК плазмиды. Наследование вставленного нужного гена тестировалось у потомков по устойчивости к канамицину. Для проверки было взято два трансгенных растения. Было проведено возвратное скрещивание трансгенного растения №1 с табаком дикого типа, при этом 50% потомков оказались канамицин устойчивыми, а 50% – чувствительными. Когда возвратное скрещивание при помощи линии табака дикого типа было проведено с трансгенным растением №2, то 75% потомков были канамицин устойчивыми, и только 25% – чувствительными.

Какова разница между трансгенными растениями №1 и №2?

5.2. С помощью Ti-плазмиды, содержащей ген устойчивости к канамицину, исследователи провели трансформацию растения *Arabidopsis*

thaliana. Были выделены два клона (А и Б), устойчивые к канамицину. После самоопыления растений получили следующие результаты:

Растение А → 3/4 потомков устойчивы к канамицину,
1/4 потомков чувствительны к канамицину;
Растение Б → 15/16 потомков устойчивы к канамицину,
1/16 потомков чувствительны к канамицину.

Схематически изобразить соответствующие хромосомы у растения А и растения Б и объяснить полученное соотношение фенотипов в F_1 у потомства растений А и Б после самоопыления.

5.3. Структурный ген величиной 0,5 кб, выделенный из генома человека имеет на одном конце сайт рестрикции для фермента рестриктазы EcoR1, а на другом для Hind III. Можно ли клонировать этот ген в *E. coli* при помощи плазмиды pUC18?

6. Литература

25. **Айала Ф., Кайгер Дж.** Современная генетика: Пер. с англ.: В 3 т. - М.: Мир, 1988. , ил.
26. **Жимулев И.Ф**. Общая и молекулярная генетика: Учеб. пособие. – Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та: Сиб. унив. изд-во, 2002. – 459 с., ил.
27. **Картель Н.А**. Биоинженерия: методы и возможности.- Мн.: Ураджай, 1989.- 143 с., ил.
28. **Методы молекулярной генетики и генной инженерии**/ Мазин А.В. и др. – Новосибирск: Наука. 1990. – 248 с.
29. **Песецкая Л.Н., Гончаренко Г.Г.** Сборник задач по генетике. Гомель: ГГУ, 2002. – 114 с.
30. **Рыбчин В.Н.** Основы генетической инженерии: Учеб. пособие для вузов.- Мн.: Выш. шк., 1986.- 186 с.: ил.
31. **Уотсон Дж., Туз Дж., Курц Д.** Рекомбинантные ДНК. Краткий курс: Пер. с англ.- М.: Мир, 1986.- 288 с., ил.
32. **Щелкунов С.Н.** Конструирование гибридных молекул ДНК.- Новосибирск: Наука, 1987.- 168 с.
33. **Льюин Б.** Гены: - Пер. с англ.- М.: Мир, 1987.- 544 с., ил.
34. **Modern genetic analysis/** Griffiths et al. – Freeman and company. New York. 1999. – 675 p.
35. **Principles of genetics.** Snustad P., Simmons M. / Second edition – John Wiley & Sons. New York. 1999. – 876 p.
36. **An introduction to genetic analysis.** Griffiths et al. – Freeman and company. New York. 2000. – 730 p.

ЗАНЯТИЕ 4

ТЕМА: плазмидные вектора – специальные устройства для доставки и клонирования чужеродных генов

<u>ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ:</u> Ознакомиться с простейшими векторами, сконструированными на основе плазмид, освоить методы введения и клонирования чужеродных ДНК с помощью плазмидных векторов на примере решения типовых задач

1. Теоретическая часть

С помощью ферментов **рестриктаз** и **лигаз** исследователи научились конструировать разнообразные по своим составным частям **гибридные (рекомбинантные) ДНК,** путём сшивки фрагментов разных видов *in vitro*.

Но как полученным гибридным генам попасть в клетку и начать там работать?

Для доставки чужеродных генов в различные организмы учёные стали применять специальные устройства, так называемые вектора. **Вектор** – это молекула ДНК, способная **самостоятельно реплицироваться** в клетках различных организмов и **обеспечивать размножение** (**клонирование**) и работу (**экспрессию**) встроенного в неё искусственно какого-либо гена. В английской литературе вектор часто обозначается словом vehicle – повозка.

Идеальными векторными молекулами, созданными самой природой, оказались **плазмиды**, представляющие собой небольшие **кольцевые молекулы ДНК**, самостоятельно живущие в цитоплазме бактерий. Плазмиды способны к автономной репликации, обладают **генами устойчивости** к различным антибиотикам, что позволяет легко обнаружить их присутствие в клетках, плазмиды могут внедряться в хромосому клетки хозяина, а также имеют участки ДНК (**сайты рестрикции**) для действия ряда рестриктаз. Это означает, что каждая такая рестриктаза может разрезать кольцо плазмидной ДНК и переводить её в линейное состояние. После чего линейную плазмиду можно легко соединить с фрагментом ДНК другого вида с подходящими липкими концами.

Первым успешным **вектором-повозкой**, который начали использовать в генной инженерии, стала кольцевая плазмида **pSC101**. Она

несет только один **участок расщепления** (**сайт рестрикции**) рестриктазой EcoR1 и превращается под действием этого фермента из кольцевой в линейную молекулу, концы которой могут «слипаться» между собой или с любыми фрагментами другой ДНК, полученными под действием той же рестриктазы. Кроме того, она несет ген устойчивости к антибиотику тетрациклину, а значит легко обнаруживается в бактериях, если их растить на среде с этим антибиотиком. Все эти свойства pSC101 и были использованы для создания и **клонирования** первых **гибридных (рекомбинантных) ДНК**, которые были бы функционально активными, то есть могли бы стабильно существовать в клетке и наделять (**трансформировать**) ее новыми признаками. Этапы введения фрагмента **чужеродной ДНК** в плазмидный вектор pSC101 с помощью рестриктазы EcoR1 схематически показаны на рис. 1.

По мере развития методов генной инженерии совершенствовались и плазмидные вектора. Широкое распространение получила **плазмида pBR322**. У нее больше участков, разрезаемых различными рестриктазами, следовательно, с ней можно «сшивать» самые разные фрагменты ДНК. Более того, у pBR322 не один, а два **маркера для селекции** на бактериальных средах: помимо тетрациклина эта плазмида кодирует еще ус-

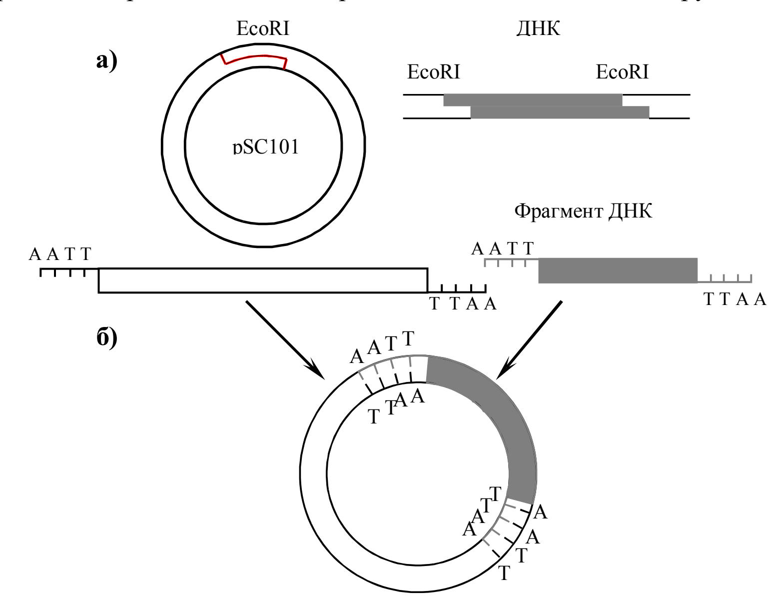


Рис. 1. Введение фрагмента рекомбинантной молекулы ДНК в плазмидный вектор pSC101 с помощью рестриктазы EcoRI, образующей «липкие» концы: **а**)—разрезание молекул ДНК рестриктазой и образование фрагментов с «липкими» концами; **б)** — гибридизация и сшивание ферментом лигазой фрагментов ДНК.

тойчивость к ампициллину (рис. 2). Если один из этих генов (например, ген устойчивости к тетрациклину) разрезать определенной рестриктазой, то при встраивании в это место фрагмента **чужеродной ДНК** целостность гена нарушается и определяемый им признак исчезает. Это позволяет легко отбирать гибридные плазмиды, **специальным образом введённые** в бактериальные клетки кишечной палочки *E. coli* при помещении их на твёрдую питательную среду с антибиотиками ампицилином и тетрациклином и на среду только с ампициллином. **Трансформированные** бактерии *E. coli,* т.е. содержащие гибридные плазмиды, растут на среде с ампицилином, но не растут на среде с двумя антибиотиками, потому что ген тетрациклиновой устойчивости в плазмиде повреждён вставкой. Селективный рост позволяет отбирать и выращивать только клетки, содержащие гибридные молекулы ДНК.

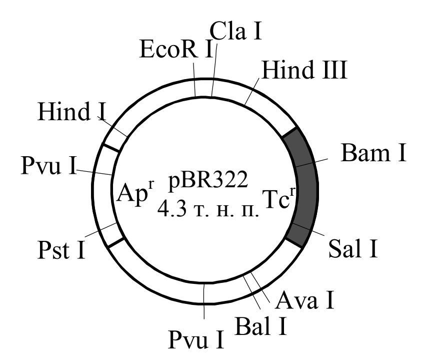
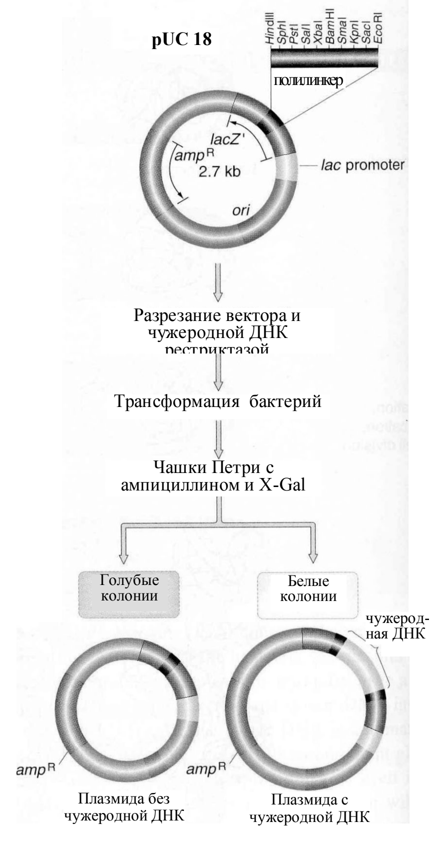


Рис. 2. Вектор pBR322, схема расположения сайтов рестрикции. Ap^r и Tc^r – гены устойчивости к ампициллину и тетрациклину



Многие годы успешно применяется еще один класс плазмидных векторов, относящихся к типу **pUC**. На рисунке слева представлена схема использования плазмиды **pUC18**. У этой плазмиды величиной 2,7 кб селекционным маркёром является ген резистентности к ампициллину (amp^r). Кроме того, имеется крайне интересный **ген lacZ**, в котором расположен **полилинкер** или **участок множественного**

клонирования длиной около 200 н.п., содержащий 10 сайтов рестрикции. В результате **инсерции (вставки)** чужеродной ДНК в полилинкер нарушается работа гена lacZ в плазмиде. Колонии бактерий содержащие нормальный и повреждённый вставкой гены легко различаются если поместить клетки в чашки Петри на среду содержащую **субстрат X-Gal**, который расщепляется ферментом **β-галак-тозидазой** (продукт гена lacZ), с образованием нерастворимого осадка сине-голубого цвета. Если образовались **колонии, окрашенные в синий цвет**, значит, в этих бактериальных клетках плазмиды не содержат вставки чужеродной ДНК. В тоже время бактериальные клетки, которые содержат плазмиды со встроенной ДНК, образуют неокрашенные колонии. Следовательно, достаточно лишь взглянуть на трансформированные бактериальные клетки и можно с уверенностью сказать успешно ли прошло клонирование вставленной в плазмиду pUC18 чужеродной ДНК или нет. Поэтому **гены подобные lacZ** получили название **репортерных.**

Помимо плазмид в качестве векторов стали успешно использовать **фаги** и **вирусы**. Позже были созданы **космиды** – особый тип векторов, сочетающих свойства плазмиды и фага.

Таким образом, последовательна была создана основная триада элементов техники генной инженерии: выделение генов, «сшивание» их с вектором, доставка гибридной структуры в конкретный **(реципиентный) организм**, где она сможет размножаться и наследоваться в потомстве.

2. Ключевые слова и понятия

рестриктазы и лигазы **вектор** **плазмиды** **кольцевые молекулы ДНК** **чужеродная ДНК** **самостоятельная репликация** **клонирование** **экспрессия** **гены устойчивости** **трансформация** **участок расщепления** **сайт рестрикции** **pSC101** **pBR322**	**маркер для селекции** **pUC18** **lacZ** **полилинкер** **участок множественного клонирования** **X-Gal** **β-галактозидаза** **фаги** **вирусы** **космиды** **реципиентный организм** **трансформированные организмы** **репортерные гены**

3. Примеры решения задач

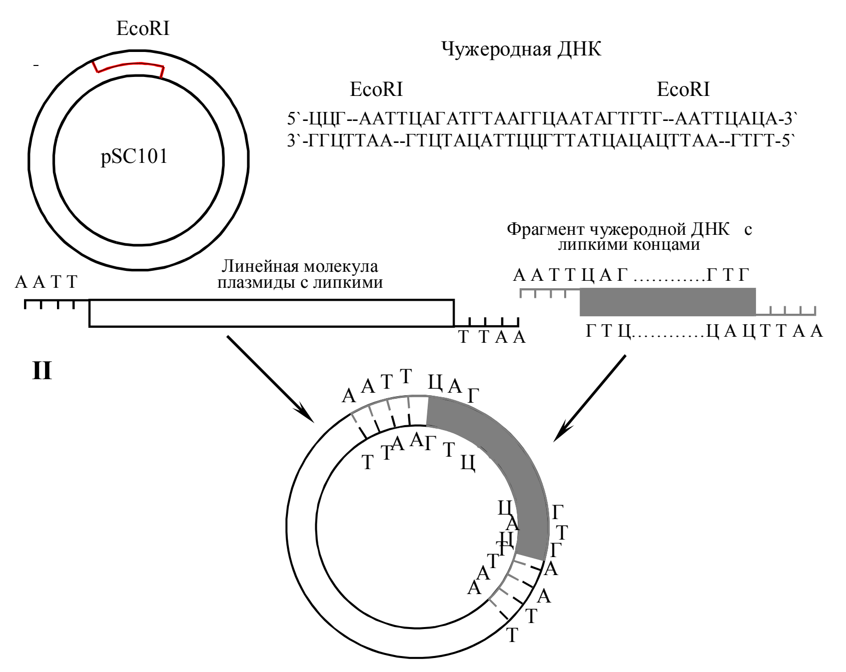
3.1. Кольцевая плазмида pSC101 несет только один участок расщепления рестриктазой EcoR1. Какой из приведённых ниже фрагментов ДНК можно встроить в данную плазмиду?

5`-ЦЦГААТТЦАГАТГТААГГЦААТАГТГТГААТТЦАЦА-3`
3`-ГГЦТТААГТЦТАЦАТТЦЦГТТАТЦАЦАЦТТААГТГТ-5`

5`-ЦЦТТАГГЦЦТГААТТААГГЦААТАГТГТГААТЦАЦАТГ-3`
3`-ГГААТЦЦГГАЦТТААТТЦЦГТТАТЦАЦАЦТТАГТГТАЦ-5`

Решение:

Поскольку плазмида pSC101 несет один участок расщепления рестриктазой EcoR1, то в неё можно встроить только тот фрагмент ДНК, который также может быть разрезан рестриктазой EcoR1. Поэтому из двух фрагментов двухцепочечной ДНК, приведённых выше, в плазмиду pSC101 можно встроить лишь первый, так как только он содержит участки разрезания для EcoR1. Схематически этапы встраивания участка чужеродной ДНК изображены на рисунке:



На первом этапе EcoR I разрезает по сайтам рестрикции плазмиду и первую молекулу ДНК с образованием фрагментов ДНК с липкими концами. На втором этапе происходит гибридизация линейной молекулы плазмиды и фрагмента чужеродной ДНК с последующим образованием

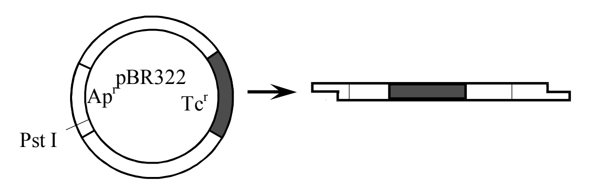
кольцевой молекулы вектора со встроенным участком чужеродной ДНК и сшивание их при помощи фермента лигазы.

3.2. При помощи рестриктазы Pst I получен фрагмент двухцепочечной ДНК с липкими концами. Можно ли встроить данный фрагмент в плазмиду pBR322? Как подтвердить, что фрагмент чужеродной ДНК встроен в плазмиду pBR322?

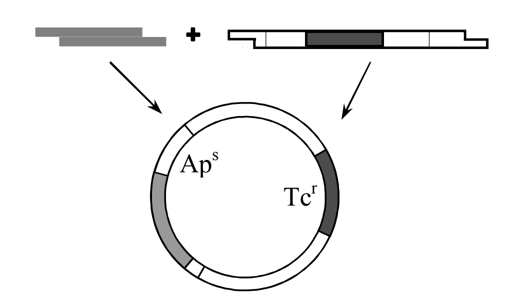
Решение:

Данный фрагмент ДНК можно встроить в плазмиду pBR322, поскольку она несет участок расщепления рестриктазой Pst I. Процесс вставки фрагмента в плазмиду аналогичен таковому в предыдущей задаче.

На первом этапе под действием рестриктазы Pst I, узнающей последовательность ЦТГЦАГ, получают линейную молекулу плазмиды с липкими концами:



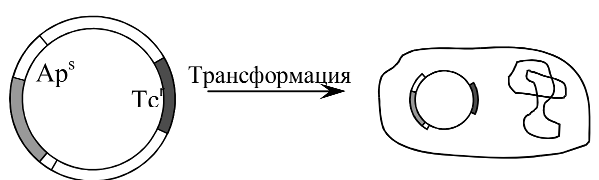
На втором этапе происходит гибридизация линейной молекулы



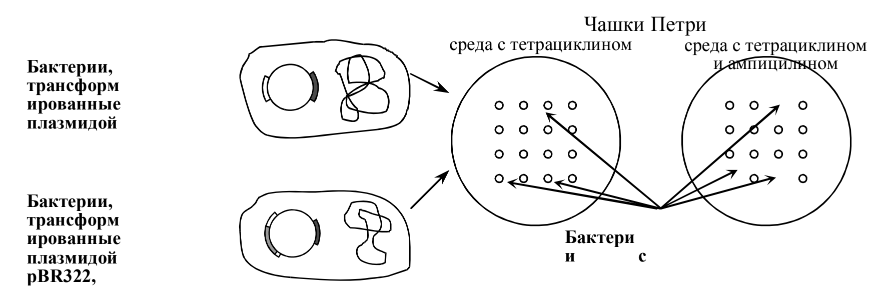
плаз-миды с фрагментом ДНК с последующим сшиванием ферментом

лигазой:

Так как сайт рестрикции для Pst I находится в гене устойчивости (резистентности) к ампициллину, то при вставке чужеродной ДНК по месту разреза будет нарушена целостность гена Ap. Соответственно



исчезнет признак устойчивости к ампициллину, кодируемый данным геном. Для того, чтобы подтвердить наличие чужеродной ДНК, гибридную плазмиду вводят в бактерию.



Трансформированные плазмидой бактерии помещают на среду в чашку Петри, содержащую только тетрациклин. Затем переносят реплику (отпечаток) колоний на среду, содержащую и тетрациклин, и ампициллин.

Если бактериальные колонии растут на среде содержащей тетрациклин, но не растут на среде с двумя антибиотиками, то это означает, что данные бактерии несут плазмиды с чужеродной ДНК, встроенной в ген устойчивости к ампициллину. Иными словами, встроить данный фрагмент в плазмиду pBR322 при помощи рестриктазы Pst I удалось.

4. Задачи для самоконтроля

4.1. Ниже приведён фрагмент ДНК, можно ли встроить его в плазмиду pSC101?

5`-АГГЦЦТГААТТААГГЦААТАГТГТГААТЦА-3`
3`-ТЦЦГГАЦТТААТТЦЦГТТАТЦАЦАЦТТАГТ-5`

4.2. Ниже приведены два одноцепочечных фрагмента ДНК. Какой из них в двухцепочечном варианте можно использовать для встраивания в плазмиду pSC101?

а) 5`-ГГЦЦТГААТТЦААГЦАТАГТГТГААТТЦАА-3`

б) 5`-ТЦЦГГАЦТТААТТГТТАТЦАЦАЦТТАГТ-5`

4.3. Кольцевая плазмида pBR322 имеет участки расщепления различными рестриктазами. Какой из ниже приведённых фрагментов двухцепочечной ДНК можно встроить в данную плазмиду?

5`-ЦЦГАТТЦАГАТГТААГГЦААТАГТГТГАТТЦАЦА-3`
3`-ГГЦТААГТЦТАЦАТТЦЦГТТАТЦАЦАЦТААГТГТ-5`

5`-ЦЦТТААГЦТТАГГЦТААГГЦААТАГААГЦТТТЦААТГ-3`
3`-ГГААТТЦГААТЦЦГАТТЦЦГТТАТЦТТЦГАААГТТАЦ-5`

4.4. Какой из ниже приведённых фрагментов двухцепочечной ДНК можно встроить в плазмиду pBR322?

5`-ЦЦГААТТЦАГАТГТААГГЦААТАГТГТГААТТЦАЦА-3`
3`-ГГЦТТААГТЦТАЦАТТЦЦГТТАТЦАЦАЦТТААГТГТ-5`

5`-ЦЦТТААГЦТТАГГЦТААГГЦААТАГААГЦТТЦАЦАТГ-3`
3`-ГГААТТЦГААТЦЦГАТТЦЦГТТАТЦ ТТЦГААГТГТАЦ-5`

4.5. В плазмиде pUC18 имеется полилинкерный участок, который содержит сайты рестрикции для 10 различных рестриктаз. Можно ли встроить в эту плазмиду приведённые ниже фрагменты двухцепочечной ДНК?

5`-ЦЦГААТТЦАГАТГТААГГЦААТАГТГТГААТТЦАЦА-3`
3`-ГГЦТТААГТЦТАЦАТТЦЦГТТАТЦАЦАЦТТААГТГТ-5`

5`-ЦЦТТААГЦТТАГГЦТААГГЦААТАГААГЦТТТЦААТГ-3`
3`-ГГААТТЦГААТЦЦГАТТЦЦГТТАТЦТТЦГАААГТТАЦ-5`

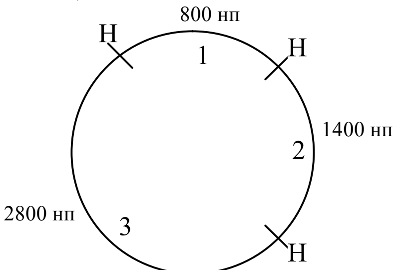
4.6. Имеется фрагмент двухцепочечной ДНК следующего состава:

5`- ТАГГАТЦЦАТТАААТАГТГГАТЦЦГТ -3`
3`-АТЦЦТАГГТААТТТАТЦАЦЦТАГГЦА-5`

Можно ли встроить данный фрагмент в плазмиду pBR322? Как подтвердить, что фрагмент чужеродной ДНК встроен в плазмиду pBR322?

4.7. В плазмиду pBR322 вставлен фрагмент чужеродной ДНК. Трансформированные такой плазмидой бактерии растут на питательной среде с ампициллином, но не растут на питательной среде, содержащей тетрациклин. Какой известной вам рестриктазой можно вырезать чужеродную ДНК из плазмиды?

4.8. Ген *Ms* находится в кольцевой плазмиде величиной 5 000 нуклеотидных пар (5 000 нп). Разрезание плазмиды рестрикционным ферментом Hind III дает фрагменты 1, 2 и 3, как показано на рисунке (H - Hind III рестрикционные сайты):



Тандемная копия гена *Ms* содержится только в одном Hind III фрагменте. Если ген *Ms* кодирует регуляторный белок MSS4, состоящий из 300 аминокислот, то укажите в каком фрагменте плазмиды расположены копии гена *Ms*?

4.9. Фрагмент ДНК мыши величиной 4 кб, имеющий на концах сайты рестрикции для EcoRI, содержит ген *M*. Этот фрагмент был встроен в плазмиду pBR322 по EcoRI сайту. Полученная рекомбинантная плазмида была разрезана двумя рестриктазами, электрофоретический спектр полученных рестрикционных фрагментов, окрашенных этидиум бромидом, представлен на рисунке 3. Для фракций на геле, полученных после разрезания сразу двумя ферментами, была проведена Саузерн-блот гибридизация с использованием в качестве зонда меченого фрагмента плазмиды pBR322.

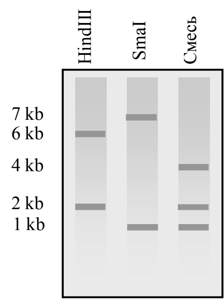
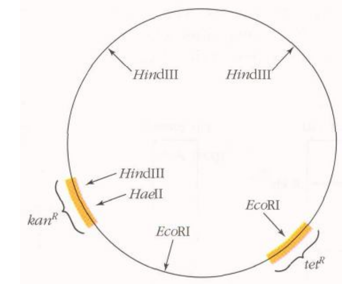


Рис. 3. Электрофореграмма фрагментов ДНК.

С какими фракциями ДНК произойдет гибридизация меченого зонда?

4.10. Ген для белка β-тубулина был получен из грибка *Neurospora*, вставлен в кольцевую плазмиду и клонирован в бактерии *E.coli*. Опишите шаг за шагом последовательность действий, необходимых для того, чтобы клонировать этот ген от родственного грибка *Podospora*, используя в качестве вектора кольцевую плазмиду pBR, представленную на рисунке справа, которая несет два гена устойчивости к антибиотикам канамицину (kan) и тетрациклину (tet).



4.11. Фрагмент человеческой ДНК величиной 6 кб был встроен в плазмиду pBR 322 по EcoRI сайту. После этого, рекомбинантная плазмида была разрезана двумя рестриктазами, а полученные образцы подвергнуты электрофорезу в агарозном геле, как и в задаче 4.9. Электрофоретический спектр полученных фрагментов представлен на рис. 4. Для фракций, полученных после разрезания сразу двумя ферментами, была проведена Саузерн-блот

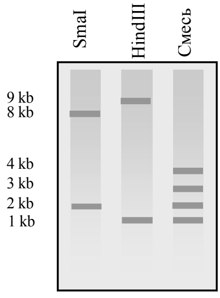


Рис. 4. Электрофореграмма фрагментов ДНК.

гибридизация с меченым зондом из плазмиды pBR322.

С какими фракциями ДНК в этом случае произойдет гибридизация меченого зонда?

4.12. Исследователи для клонирования важного фрагмента человеческой ДНК величиной 1кб использовали плазмиду pUC18. Трансформированные гибридной плазмидой клетки *E. coli* были помещены на питательную среду, содержащую X-Gal. После культивирования в чашках Петри появились колонии синего и белого цвета. Удалось ли встроить нужный фрагмент человеческой ДНК в плазмиду pUC18?

4.13. Интересный фрагмента человеческой ДНК величиной 1 кб был встроен в плазмиду pUC18 по Hind III сайту и клонирован в *E. coli.* Если выделить гибридную плазмиду и разрезать рестриктазой Hind III то как будет выглядеть спектр фрагментов после электрофореза в агарозном геле в случае когда человеческая ДНК успешно встроилась в pUC18 и когда этого не произошло?

4.14. Изменится ли электрофоретический спектр фрагментов после электрофореза в агарозном геле если, выделенную по условиям задачи 4.13 гибридную плазмиду pUC18 разрезать сразу двумя рестриктазами Hind III и EcoR1?

5. Задачи повышенной сложности

5.1. Исследователи получили трансгенные растения табака, в которые, используя в качестве вектора специализированную Ti-плазмиду, был введен нужный ген вместе с подсоединенным к нему канамицинустойчивым геном предварительно встроенные во фрагмент Т-ДНК плазмиды. Наследование вставленного нужного гена тестировалось у потомков по устойчивости к канамицину. Для проверки было взято два трансгенных растения. Было проведено возвратное скрещивание трансгенного растения №1 с табаком дикого типа, при этом 50% потомков оказались канамицин устойчивыми, а 50% – чувствительными. Когда возвратное скрещивание при помощи линии табака дикого типа было проведено с трансгенным растением №2, то 75% потомков были канамицин устойчивыми, и только 25% – чувствительными.

Какова разница между трансгенными растениями №1 и №2?

5.2. С помощью Ti-плазмиды, содержащей ген устойчивости к канамицину, исследователи провели трансформацию растения *Arabidopsis*

thaliana. Были выделены два клона (А и Б), устойчивые к канамицину. После самоопыления растений получили следующие результаты:

Растение А → 3/4 потомков устойчивы к канамицину,
1/4 потомков чувствительны к канамицину;

Растение Б → 15/16 потомков устойчивы к канамицину,
1/16 потомков чувствительны к канамицину.

Схематически изобразить соответствующие хромосомы у растения А и растения Б и объяснить полученное соотношение фенотипов в F_1 у потомства растений А и Б после самоопыления.

5.3. Структурный ген величиной 0,5 кб, выделенный из генома человека имеет на одном конце сайт рестрикции для фермента рестриктазы EcoR1, а на другом для Hind III. Можно ли клонировать этот ген в *E. coli* при помощи плазмиды pUC18?

6. Литература

37. **Айала Ф., Кайгер Дж.** Современная генетика: Пер. с англ.: В 3 т. - М.: Мир, 1988. , ил.
38. **Жимулев И.Ф**. Общая и молекулярная генетика: Учеб. пособие. – Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та: Сиб. унив. изд-во, 2002. – 459 с., ил.
39. **Картель Н.А**. Биоинженерия: методы и возможности.- Мн.: Ураджай, 1989.- 143 с., ил.
40. **Методы молекулярной генетики и генной инженерии**/ Мазин А.В. и др. – Новосибирск: Наука. 1990. – 248 с.
41. **Песецкая Л.Н., Гончаренко Г.Г.** Сборник задач по генетике. Гомель: ГГУ, 2002. – 114 с.
42. **Рыбчин В.Н.** Основы генетической инженерии: Учеб. пособие для вузов.- Мн.: Выш. шк., 1986.- 186 с.: ил.
43. **Уотсон Дж., Туз Дж., Курц Д.** Рекомбинантные ДНК. Краткий курс: Пер. с англ.- М.: Мир, 1986.- 288 с., ил.
44. **Щелкунов С.Н.** Конструирование гибридных молекул ДНК.- Новосибирск: Наука, 1987.- 168 с.
45. **Льюин Б.** Гены: - Пер. с англ.- М.: Мир, 1987.- 544 с., ил.
46. **Modern genetic analysis/** Griffiths et al. – Freeman and company. New York. 1999. – 675 p.
47. **Principles of genetics.** Snustad P., Simmons M. / Second edition – John Wiley & Sons. New York. 1999. – 876 p.
48. **An introduction to genetic analysis.** Griffiths et al. – Freeman and company. New York. 2000. – 730 p.

ЗАНЯТИЕ 5

ТЕМА: фаговые и космидные вектора и создание геномных библиотек

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Ознакомиться с векторами, созданными на основе фага λ и космидами и получить представление о геномных библиотеках, освоить методы клонирования ДНК в фагах и космидах и способы создание геномных библиотек на примере решения типовых задач

1. Теоретическая часть

В принципе не составляет труда получить тысячи **химерных плазмид,** каждая из которых содержит специфический фрагмент, например ДНК человека, мыши или дрозофилы и посредством **скрининга** большого числа таких плазмид исследовать **весь геном** любого из этих организмов. Однако, как оказалось плазмиды, содержащие **большие вставки хромосомной ДНК** не стабильны и при репликации постепенно уменьшаются в размерах. Это связано с тем, что генетический материал ненужный для размножения плазмиды неизбежно утрачивается.

Большие фрагменты хромосомной ДНК (размером около 15 кб) нестабильные в составе плазмид становятся весьма стабильными при встраивании их в специально сконструированные **штаммы фага λ.** ДНК этого фага сравнительно невелика, гены его хорошо изучены и размножается он в бактериальных клетках очень интенсивно.

При получении **λ векторов** используется то обстоятельство, что вся **центральная часть** молекулы **ДНК фага λ** не нужна для репликации в *E. coli*, а функционирует только при интеграции фаговой ДНК в бактериальную хромосому (в состоянии **лизогении**). Были сконструированы специальные штаммы λ, в ДНК которых сайты для EcoR1 расположены таким образом, что правый и левый **концевые фрагменты фаговой ДНК**, необходимые для репликации остаются нетронутыми. После расщепления с помощью EcoR1 эти концевые фрагменты благодаря их сравнительно большим размерам легко отделить от всех остальных EcoR1-фрагментов и использовать затем для получения новых λ-подобных фагов, каждый из которых содержит **левый и правый концевые фрагменты,** а также **вставку чужеродной ДНК** размером **около 15 кб.** Удобным оказалось то обстоятельство, что для **созревания фага λ** его ДНК должна иметь длину около 45 кб, благодаря чему при

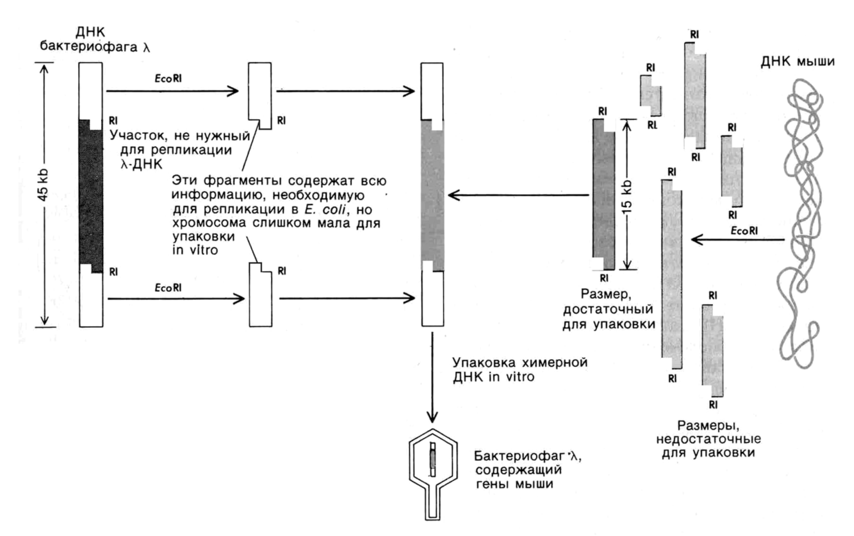


Рис. 1. Клонирование генов ДНК мыши в бактериофаге λ, с использованием рестриктазы EcoR1 и соответствующих сайтов рестрикции в геномах фага и мыши.

конструировании химерных ДНК *in vitro* для последующего размножения отбираются только те из них, которые содержат оба конца фаговой ДНК и вставку чужеродной ДНК подходящего размера, т.е. около 15 кб. Этапы клонирования фрагмента ДНК мыши длиной 15 кб в бактериофаге λ, с использованием рестриктазы EcoR1 и соответствующих сайтов рестрикции в **геномах фага и мыши** представлены на рис. 1.

Многие гены эукариот оказались длиннее 15 кб, а некоторые достигают 35-40 кб. Кроме того, **клонирование в фаге λ** обычно не позволяет выделить два соседних гена в виде единой молекулы рекомбинантной ДНК. Поэтому клонирование значительно более длинных фрагментов ДНК в *E. coli* проводится в **космидах**.

Космиды - это искусственные конструкции, созданные на основе плазмид и фага λ. Космида имеет **последовательность *ori***, позволяющую ей реплицироваться в *E. coli*, **селекционный маркёр *amp*^{r}**, **полилинкер** (сайт множественного клонирования) и так называемые ***cos*-сайты** встроенные из фага λ. *Cos*-сайты представляют из себя расположенные на обоих концах молекулы ДНК фага λ комплементарные одноцепочечные участки величиной 12 нуклеотидов, благодаря которым линейная форма фага соединяясь со своим соседом через *cos*-сайт образует длинную цепь из сотен фаговых ДНК или **конкатамер**. Ферменты, катализирующие упаковку фаговой ДНК узнают в конкатемере два *cos*-сайта находящихся на расстоянии 35-45 кб выщепляют расположенную между ними ДНК и упаковывают её в **головку фага**. Поэтому, когда в относительно

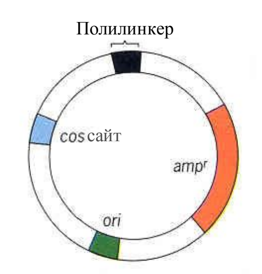


Рис. 2. Структура типичного космидного вектора, объединяющего свойства фага λ и плазмиды.

небольшую космиду, несущую *cos*-сайты, встраивается чужеродная ДНК размером 35-45 кб, молекула достигает необходимой длины что бы упаковаться в фаговую частицу. Затем полученные фаги, несущие вставленную чужеродную ДНК вводятся в клетки *E. coli* для последующего размножения (клонирования).

На следующем этапе развития генной инженерии учёные начали включать в векторы все гены различных организмов. Иными словами они начали создавать **генные банки** или **генные библиотеки**.

Генные инженера, **раздробив** с помощью **определённой рестриктазы (техника «дробовика») суммарную ДНК конкретного организма** на фрагменты, добавляют к ним вектор, обработанный той же рестриктазой, и всю эту смесь используют для **трансформации бактерий**. Обычно в каждую рекомбинантную клетку имеет шанс попасть одна молекула ДНК, представляющая собой гибрид вектора и какого-нибудь одного из многих фрагментов присутствовавших в смеси. Клетка, получившая гибридную ДНК, размножившись, образует клон. **Набор клонов** бактерий содержащих различные рекомбинантные молекулы, включившие все возможные фрагменты ДНК определённого организма и составляют **геномную библиотеку (банк генов)**. Техника «дробовика» позволила получить **набор клонов бактерий** или **гибридных фагов** различающихся по включённым фрагментам ДНК. Уже в 1974 г. Д. Хогнес с сотрудниками создали **геномную библиотеку дрозофилы** в клетках *E. coli*. Через два года американцы Л. Кларк и Д. Карбон стали владельцами **библиотеки всех генов** самой бактерии ***E. coli***. Вслед за этим были получены **геномные библиотеки** ряда других **организмов**, включая **человека**.

Допустим, что у нас уже есть геномная библиотека какого-то животного, скажем морской свинки. Мы получили эту библиотеку выделив из клеток свинки ДНК, расщепив её подходящей рестриктазой на фрагменты, встроив эти фрагменты в вектор и введя полученную рекомбинантную ДНК, например в *E. coli.* Но в какую из тысяч трансформированных клеток *E. coli* попал интересующий нас ген? Для решения этой задачи поиска иголки в стоге сена, в настоящее время применяются так называемые **кДНКовые зонды,** которые представляют собой радиактивно меченную ДНК характерную для конкретного гена.

Но сначала учёные научились выделять в достаточных количествах мРНК отдельных генов. Дело в том, что практически все мРНК эукариот на своих 3' концах содержат **последовательность poly(A)**. Эта поли(A)

последовательность предоставляет прекрасную возможность для синтеза ДНК комплементарной мРНК. Если смешать с мРНК **короткие oligo(dT),** они будут гибридизоваться с poly (A) и послужат затравками для работы фермента **обратная транскриптаза** (рис. 3). Этот интересный фермент открытый Тёминым и Балтимором использует РНК как матрицу для синтеза **комплементарной цепи ДНК или кДНК (cDNA).** Необходимо отметить, что она соответствует только **стру-ктурной части гена,** которая кодирует его белковый продукт, а **регуляторные части гена** в кДНК не представлены.

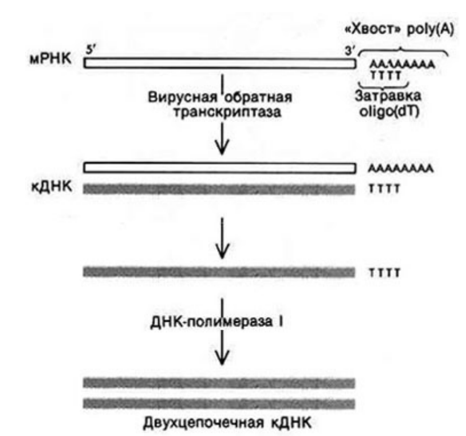


Рис. 3. Синтез двухцепочечной кДНК на мРНК. С poly(A) «хвостом» мРНК гибридизуют короткий фрагмент oligo(dT). Этот - фрагмент служит затравкой для обратной транскриптазы, которая использует мРНК в качестве матрицы для синтеза комплементарной цепи ДНК. Оставшуюся мРНК разрушают обработкой NaOH, и с помощью ДНК-полимеразы I завершают синтез второй цепи ДНК, в результате чего получается двухцепочечная

Полученная с помощью обратной транскриптазы **двухцепочечная молекула кДНК** встраивается затем в плазмиду либо с помощью «хвостов» достроенных **концевой трансферазой**, либо путём пришивания к **концам кДНК** искусственных сайтов рестрикции. Эти сайты, так называемые **линкеры** представляют собой последовательности, состоящие из 8-10 нуклеотидных пар химически синтезированных олигонуклеотидов. Линкеры пришивают к двухцепочечной кДНК с помощью ДНК-лигазы, а затем расщепляют их рестриктазой, и кДНК, содержащую теперь липкие концы встраивают в плазмиду разрезанную той же рестриктазой. Затем, полученную рекомбинантную плазмиду, содержащую кДНК вводят в клетки соответствующего штамма *E. coli*, где она размножается.

В настоящее время разработаны специальные **методы скрининга** (поиска), позволяющие с помощью кДНК используемых в качестве зондов обнаруживать нужные гены, хранящиеся в геномных библиотеках. Чаще всего геномная библиотека хранится в *E. coli* в виде набора бактериальных колоний, каждая из которых содержит различный фрагмент геномной ДНК. Если в чашках Петри к поверхности плотной среды, на которой посеяны различные колонии *E. coli*, хранящие геномную библиотеку приложить **фильтр из нитроцеллюлозы** каждая колония разделится – часть останется на чашке, а часть отпечатается на

фильтре (рис. 4). Под действием раствора щелочи бактерии на фильтре **лизируются**, а ДНК распадается на однонитчатые цепочки. После того как фильтр прогреют при высокой температуре в вакуумной печи, цепи



Рис. 4. Идентификация бактериальных колоний, содержащих плазмиду со вставкой фрагмента геномной ДНК. Конструируют библиотеку геномной ДНК, например в pBR322 и трансформируют ею *E. coli,* после чего получают «реплику» образовавшихся колоний на нитроцеллюлозном фильтре. Бактерии с рекомбинантной плазмидой, содержащей последовательности, гомологичные последовательности меченого зонда, гибридизуются и выявляются радиоавтографически. Затем на исходной чашке отыскивают колонию, локализованную там же, где и соответствующая колония на фильтре-реплике.

ДНК прочно свяжутся с нитроцеллюлозой. Затем на фильтр наносят радиоактивно меченную кДНК интересующего гена. **Меченный кДНК-зонд** будет комплементарно гибридизоваться только с фрагментом геномной ДНК содержащим искомый ген. Если на нитроцеллюлозный фильтр положить рентгеновскую плёнку, то местоположение метки можно определить по участкам затемнения. Этот метод называемый **ДНК-ДНК гибридизацией** даёт возможность узнать в какой колонии бактерий находится наш ген. Колонии отбирают, выделяют из неё ДНК и анализируют. Убедившись, что нужный ген «пойман», решают, как изучать его строение, определить функции, как заставить его работать в новых хозяевах и нельзя ли улучшить его свойства.

2. Ключевые слова и понятия

химерные плазмиды	**трансформация бактерий**
большие вставки хромосомной ДНК	**набор клонов бактерий**
штаммы фага λ	**набор клонов гибридных фагов**
λ вектор	**геномная библиотека дрозофилы**
центральная часть ДНК фага λ	**библиотеки всех генов *E. coli***
лизогения	**кДНКовые зонды**
концевые фрагменты фаговой ДНК	**последовательность poly(A)**
созревание фага λ	**короткие oligo(dT)**
геном фага λ	**обратная транскриптаза**
геном мыши	**ДНК полимераза 1**
клонирование в фаге λ	**комплементарная цепь ДНК**
космиды	**кДНК (cDNA)**

последовательность *ori*	**структурная часть гена**
селекционный маркёр *amp*^{r}	**регуляторная часть гена**
полилинкер	**линкеры**
***cos*-сайты**	**двухцепочечная молекула кДНК**
конкатамер	**концевая трансфераза**
головка фага	**методы скрининга**
генные банки	**фильтр из нитроцеллюлозы**
геномные библиотеки	**лизирование**
техника «дробовика»	**меченный кДНК-зонд**
суммарная ДНК организма	**ДНК-ДНК гибридизация**

3. Примеры решения задач

3.1. Из семнадцатой хромосомы мыши удалось выделить интересный ген, расположенный во фрагменте ДНК величиной около 9 кб. Причем по обоим краям этого фрагмента имеются сайты рестрикции для фермента EcoR1. Можно ли успешно клонировать этот фрагмент ДНК мыши в бактериофаге λ?

Решение:

Успешно клонировать фрагмент ДНК мыши величиной 9 кб в бактериофаге λ не удастся. Даже если этот фрагмент мыши на краях имеет сайты рестрикции для фермента EcoR1 и успешно встроится в ДНК бактериофага λ, все равно ДНК фага не достигнет размера 45 кб, т.е. окажется слишком мала для того, чтобы упаковаться в белковую оболочку (головку фага) и соответственно не сможет успешно размножаться (клонироваться).

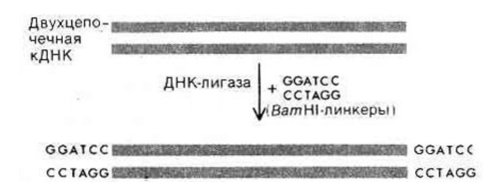
3.2. Исследователям в ходе трудоёмких экспериментов по мРНК, используя фермент обратную транскриптазу удалось получить кДНК гена Adh крысы. Для дальнейших экспериментов потребовалось большое количество кДНК этого гена.

Каким оптимальным способом исследователям можно клонировать кДНК гена Adh крысы для наработки его достаточного количества?

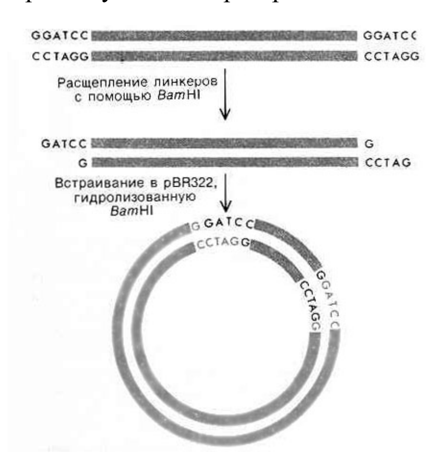
Решение:

Полученную кДНК гена Adh крысы можно успешно клонировать в плазмиде pBR322, трансформировав ею *E. coli*.

На первом этапе к концам двухцепочечной кДНК гена Adh нужно с помощью фермента ДНК-лигазы пришить Bam 1 линкеры.



Затем с помощью рестриктазы Bam 1 необходимо расщепить линкерные участки и кДНК, содержащую теперь липкие концы встроить в плазмиду pBR322 разрезанную той же растриктазой.



И наконец полученную рекомбинантную плазмиду, содержащую нашу кДНК нужно ввести в клетки штамма *E. coli*, где она будет клонироваться (размножаться). Причём трансформированные нашей рекомбинантной плазмидой штаммы *E. coli* будут успешно размножаться в чашках Петри только на культуральных средах не содержащих тетрациклин, поскольку введённая кДНК по рестрикционному сайту Bam1 нарушит целостность гена Tc^r в плазмиде pBR322.

4. Задачи для самоконтроля

4.1. Какой из ниже приведённых фрагментов двухцепочечной ДНК можно клонировать в бактериофаге λ?

5`-ЦЦГААТТЦАГАТГТААГГЦААТАГТГТГААТТЦАЦА-3`
3`-ГГЦТТААГТЦТАЦАТТЦЦГТТАТЦАЦАЦТТААГТГТ-5`

5`-ЦЦТТААГЦТТАГГЦТААГГЦААТАГААГЦТТЦАЦАТГ-3`
3`-ГГААТТЦГААТЦЦГАТТЦЦГТТАТЦ ТТЦГААГТГТАЦ-5`

4.2. Из семнадцатой хромосомы человека удалось выделить интересный ген, расположенный во фрагменте ДНК величиной около 8 кб. На флангах этого фрагмента имеются сайты рестрикции для фермента EcoR1. Можно ли успешно клонировать этот фрагмент человеческой ДНК в бактериофаге λ?

4.3. Четвертичная структура человеческого белка – гемоглобина состоит из двух α- и двух β-глобиновых полипептидных цепочек. В

состав одной полипептидной цепочки β-глобина входит 154 аминокислот.

Какова будет величина соответствующей β-глобиновой кДНК, выраженной в нуклеотидных парах?

4.4. В геноме эукариотического организма имеется сложный тандемно дуплецированный ген. Величина ДНК одной копии этого гена составляет чуть больше 20 кб.

Сумеют ли генные инженера в своём арсенале найти подходящий вектор для клонирования тандемной копии данного гена?

4.5. Получен интересный фрагмент двухцепочечной человеческой ДНК с тупыми концами величиной около 200 нуклеотидных пар. Причем, в этом фрагменте не оказалось сайтов рестрикции для удобных рестриктаз, расщепляющих ДНК с образованием липких концов.

Удастся ли успешно клонировать этот фрагмент человеческой ДНК в известных вам плазмидах?

4.6. Исследователям в ходе трудоёмких экспериментов по мРНК, используя фермент обратную транскриптазу, удалось получить кДНК гена Pgm дрозофилы. Для дальнейших экспериментов потребовалось большое количество кДНК этого гена.

Каким способом исследователям можно клонировать кДНК гена Pgm дрозофилы для наработки его достаточного количества?

4.7. В лаборатории, используя обратную транскриптазу, удалось получить кДНК важного гена человека. Возникла естественная необходимость в получении большое количество кДНК этого гена.

Какая последовательность должна быть у линкера для этой кДНК что бы можно было её клонировать в плазмиде pBR322 по маркёру устойчивости к ампиницилину?

4.8. Как уже отмечалось, гаплоидный геном дрожжевого грибка *Saccharomyces cerevisiae,* состоящий из одной хромосомы, содержит около $13{,}5 \times 10^6$ нуклеотидных пар ДНК. При создании геномной библиотеки дрожжевого грибка использовали рестрикционный фермент EcoRI. Полученные фрагменты были встроены в вектор и клонированы в *E. coli.*

Сколько различных клонов содержащих отличающиеся фрагменты ДНК *Saccharomyces cerevisiae* составляют геномную библиотеку этого вида?

4.9. Поскольку рестриктаза EcoRI узнаёт последовательность ДНК, состоящую из шести нуклеотидов то она будет разрезать молекулу двухцепочечной ДНК в среднем один раз на 4096 нуклеотидных пар.

Можно ли клонировать какие либо фрагменты ДНК дрожжевого грибка *Saccharomyces cerevisiae* в фаге λ если они были разрезаны

ферментом EcoRI?

4.10. Геном *Drosophila melanogaster,* состоящий из четырёх хромосом, содержит около 10^8 нуклеотидных пар ДНК. При создании геномной библиотеки дрозофилы меланогастер также использовали рестрикционный фермент EcoRI, а полученные фрагменты были встроены в вектор и клонированы в *E. coli.*

Сколько различных клонов содержащих отличающиеся фрагменты ДНК *Drosophila melanogaster* составляют геномную библиотеку вида в данном случае?

4.11. В ходе создания геномной библиотеки человека использовали рестрикционный фермент Not I, узнающий октамерную последовательность ГЦГГЦЦГЦ, а полученные фрагменты были встроены в вектор и клонированы в *E. coli.*

Каково в этом случае будет минимальное число различных клонов содержащих отличающиеся фрагменты ДНК в составе геномной библиотеке человека?

4.12. Исследователи получили кДНК для белка морской свинки. Используя эту кДНК в качестве радиоактивно меченного зонда было проведено скринирование геномной библиотеки и найден клон содержащий структурный ген для данного белка.

Будут ли отличаться электрофоретические спектры этой кДНК и образца ДНК найденного структурного гена после электрофореза в агарозном геле?

4.13. С помощью полученной радиоактивно меченной кДНК для белка человека был проведён скрининг геномной библиотеки и найден клон, содержащий структурный ген для данного белка.

Как будет выглядеть электрофореграмма после электрофореза в агарозном геле образца этой кДНК и образца ДНК найденного структурного гена?

4.14. Была получена кДНК для важного белка морской свинки. У этой кДНК отсутствует сайт рестрикции для фермента EcoRI. Когда эта кДНК была использована как радиоактивный зонд для блот-гибридизационного анализа с фрагментами геномной ДНК свинки, порезанной EcoRI, то на радиограмме после Саузерн-блот анализа в образце ДНК свинки присутствовали три фракции (рис. 5).

Рис. 5. Авторадиограмма фрагментов ДНК после Саузерн-блот анализа.

Могут ли полученные три фракции на радиограмме свидетельствовать о том, что в геноме морской свинки имеется три копии гена для этого

важ-ного белка?

5. Задачи повышенной сложности

5.1. Каким образом можно выделить из геномной библиотеки человека насчитывающий много тысяч различных клонов *E. coli* структурный ген кодирующий молекулу β-глобина?

5.2. Была получена кДНК для важного белка зеленой мартышки. Эта кДНК была использована как радиоактивный зонд для Саузерн-блот гибридизационного анализа с фрагментами геномной ДНК мартышки, порезанной рестрикционным ферментом Hind III. Авторадиограмма фрагментов геномной ДНК и кДНК этого гена, расщепленных ферментом HindIII представлена на рисунке справа (рис. 6).

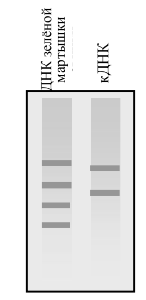


Рис. 6. Авторадиограмма фрагментов ДНК зеленой мартышки после Саузерн-блот анализа.

Почему, в результате обработки рестрикционным ферментом HindIII, после Саузерн-блот гибридизации электрофоретический спектр образцов геномной ДНК для этого важного белка мартышки состоит из четырех фракций, тогда как кДНК только из двух?

6. Литература

49. **Айала Ф., Кайгер Дж.** Современная генетика: Пер. с англ.: В 3 т. – М.: Мир, 1988., ил.
50. **Жимулев И.Ф**. Общая и молекулярная генетика: Учеб. пособие. – Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та: Сиб. унив. изд-во, 2002. – 459 с., ил.
51. **Картель Н.А**. Биоинженерия: методы и возможности. Мн.: Ураджай, 1989.- 143 с., ил.
52. **Методы молекулярной генетики и генной инженерии**/ Мазин А.В. и др. – Новосибирск: Наука. 1990. – 248 с.
53. **Песецкая Л.Н., Гончаренко Г.Г.** Сборник задач по генетике. Гомель: ГГУ, 2002. – 114 с.
54. **Рыбчин В.Н.** Основы генетической инженерии: Учеб. пособие для вузов.- Мн.: Выш. шк., 1986. – 186 с.: ил.
55. **Уотсон Дж., Туз Дж., Курц Д.** Рекомбинантные ДНК. Краткий курс: Пер. с англ. – М.: Мир, 1986. – 288 с., ил.
56. **Щелкунов С.Н.** Конструирование гибридных молекул ДНК. – Новосибирск: Наука, 1987. – 168 с.
57. **Льюин Б.** Гены: – Пер. с англ. – М.: Мир, 1987. – 544 с., ил.

58. **Modern genetic analysis.** Griffiths et al. – Freeman and company. New York. 1999. – 675 p.
59. **Principles of genetics.** Snustad P., Simmons M. / Second edition – John Wiley & Sons. New York. 1999. – 876 p.
60. **An introduction to genetic analysis.** Griffiths et al. – Freeman and company. New York. 2000. – 730 p.

ЗАНЯТИЕ 6

ТЕМА: Генная дактилоскопия и полный сиквенс (прочтение) нуклеотидных последовательностей ДНК

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Ознакомиться с методом генной дактилоскопии (фингерпринта ДНК) у человека и методами прочтения (секвенирования) ДНК у разных видов на примере решения типовых задач

1. Теоретическая часть

В геноме каждого человека имеется так называемая **минисателлитная ДНК.** В основе её строения лежит **строгая последовательность** состоящая **из 13 нуклеотидов**. Цепочка одной **минисателлитной ДНК** может насчитывать таких повторяющихся последовательностей от одной до нескольких тысяч. У людей имеется два и более десятков **минисателлитных цепочек** расположенных на разных хромосомах. В совокупности они образуют набор минисателлитных ДНК различающихся по длине. Было обнаружено, что **для каждого человека характерен** свой, присущий только ему **вариант набора** таких **тандемно повторяющихся последовательностей отличающихся по длине**, то есть по числу отдельных звеньев. Иными словами ситуация оказалась сходной с отпечатками пальцев человека у каждого имеется собственная минисателлитная ДНК. Поэтому и метод анализа фрагментов минисателлитной ДНК получил название **генной дактилоскопии (фингерпринт ДНК).**

Технология генной дактилоскопии включает ряд хорошо разработанных и уже рассмотренных нами методов. Сначала из каких либо клеток выделяют ДНК и с помощью рестриктаз разрезают её на фрагменты разной длины. Среди фрагментов естественно будут те, которые содержат **вариабельные минисателлиты.** Далее проводится стандартный Саузерн-блот анализ. Все полученные фрагменты подвергаются электрофорезу в геле и **фракции содержащие минисателлитную ДНК** выявляются с помощью специального меченого зонда комплементарного к звену из 13 повторяющихся нуклеотидов. Так как зонд радиоактивен, то он засвечивает ренгеновскую плёнку только в определённых местах, давая картину из нескольких десятков чередующихся темных фракций, соответствующих отдельным минисателлитам. Схематическое изображение этапов использования **вариабельного числа тандемных повторов** при проведении

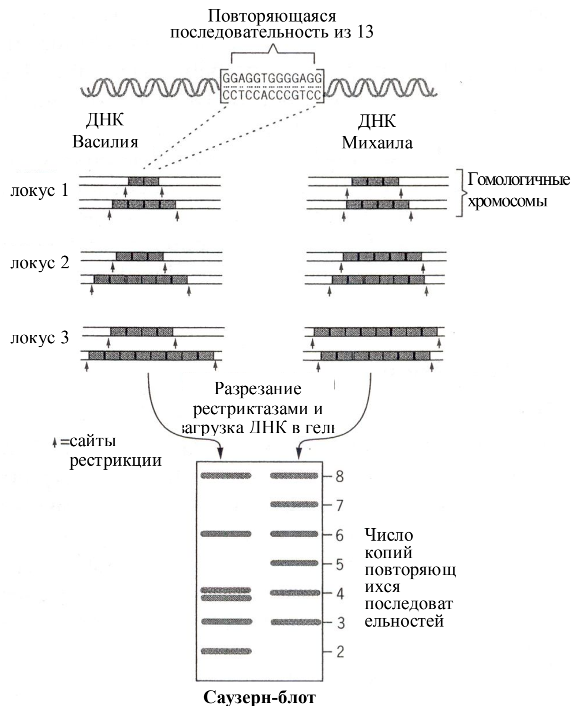


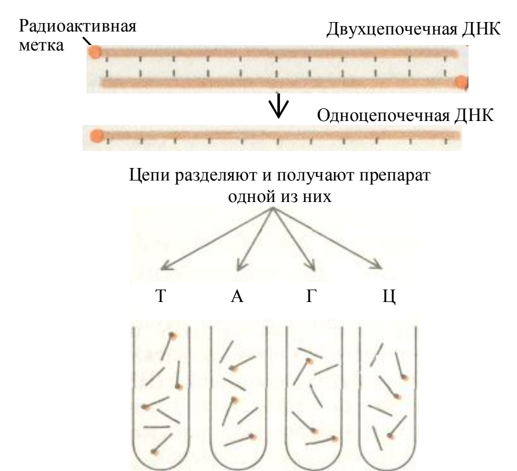
Рис. 1. Упрощенная схема использования вариабельного числа тандемно повторяющихся последовательностей в проведении фингерпринта ДНК

фингерпринта ДНК представлена на рис. 1.

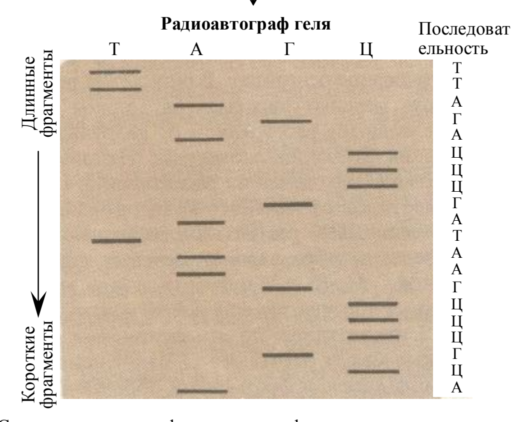
Для двух людей картина на авторадиограмме существенно отличается как по числу, так и по расположению и интенсивности фракций. Чем более родственны анализируемые особи, тем число сов-падающих полос после **фингерпринта ДНК** будет больше и наоборот. Полностью совпадающие спектры **минисателлитной ДНК** выявляются только у однояйцевых близнецов. Следует добавить, что метод фингерпринта минисателлитной ДНК обладает высокой чувствительностью и анализ можно проводить на одной капле крови или нескольких волосяных луковиц.

Фингерпринт, Саузерн блоттинг и другие методы анализа рестрикционных фрагментов ДНК дали возможность сделать много важных открытий в генной инженерии, но настоящим успехом стала разработка **методов сиквенирования фрагментов ДНК** длиной 100-500 нуклеотидных пар. Первый прямой **метод определения последовательности ДНК** был предложен Ф. Сэнгером в 1975 г. Он основан на **элонгации ДНК** при помощи фермента **ДНК-полимеразы**. Этим способом была быстро сиквенирована короткая ДНК фага φх174, длиной 5,4 кб. Столь же мощный метод сиквенса ДНК был разработан А. Максамом и У. Гилбертом в 1977 г. в Гарвардском университете. С его помощью менее чем за год удалось установить последовательность ДНК для вируса sv-40 (5,2 кб) и плазмиды pBR322 (4,3 кб).

Метод **сиквенирования ДНК по Максамому-Гилберту** заключается в следующем. Один из концов фрагмента ДНК, последовательность



Химическим путем разрушают одно из четырех оснований, в результате чего происходит расщепление цепи в соответствующих точках. Условия реакции подбирают таким образом, чтобы в каждой точке расщеплялись только некоторые из цепей; при этом получается набор фрагментов разной длины



С помощью электрофореза в геле фрагменты разделяются по размеру; те из них. которые содержат радиоактивную метку, оставляют «отпечатки» на рентгеновской пленке. По положению этих отпечатков можно определить, какое именно основание было разрушено при образовании каждого из радиоактивных фрагментов

которого нужно прочитать (секвенировать) метят с помощью ^{32}Р. **Препарат меченой ДНК** делят на четыре порции и каждую из них обрабатывают реагентом, специфи-чески разрушающим одно из четырех оснований ДНК. Условия реакции подбирают таким образом, чтобы на каждую молекулу ДНК приходилось лишь несколько повреждений. Когда эти повреждённые молекулы обрабатывают пиперидином, в ДНК образуется разрыв в том месте, где находилось разрушенное основание. В результате получается **набор меченых фрагментов**, длины которых определяются расстоянием от разрушенного основания до конца молекулы. Например, если остатки Г находятся на расстоянии 2, 6, 11 и 16 нуклеотидов от меченого конца, как в случае рассмотренном на рисунке слева, то обработка данной цепи ДНК реагентами, разруша-ющими Г, приведёт к образованию меченых фрагментов длиной 2, 6, 11 и 16 нуклеотидов (при этом, естественно образуются еще и фрагменты длинной 3 и 4 нуклеотида, но эти фрагменты расположенные между остатками Г будут не меченными). Наборы меченых фрагментов, образующихся при каждой из четырёх реакций подвергают электрофорезу в соседних дорожках полиакриламид-

ного геля, при этом происходит разделение фрагментов ДНК в соответствии с их размерами. Затем проводят радиоавтографию геля. Набор полос, регистрируемых на рентгеновской плёнке, «**читают**», определяя таким образом **нуклеотидную последовательность ДНК**. Так в примере представленном на рисунке стр. 65 последовательность цепочки ДНК от меченого конца будет следующая АЦГЦЦЦГААТАГЦЦЦАГАТТ.

Для анализа последовательностей ДНК широко используется также метод Сэнгера основанный на использовании дидезокси нуклеотидов.

В последние годы вместо радиоактивных меток при анализе последовательностей ДНК используются флюорисцентное окрашивание. Флюорисцентные красители разного цвета применяются для каждого из четырёх нуклеотидов и четыре смеси электрофорезируются вместе. Флюорисцентный анализ позволяет определять последовательность ДНК автоматически, что даёт возможность прочитывать более 1000 нуклеотидных пар за одну операцию.

2. Ключевые слова и понятия

минисателлитная ДНК **строгая последовательность из 13 нуклеотидов** **минисателлитная цепочка** **тандемно повторяющиеся последовательности** **генная дактилоскопия** **фингерпринт ДНК** **гипервариабельные минисателлиты** **участки минисателлитной ДНК отличающиеся по длине**	**методы сиквенирования фрагментов ДНК** **метод определения последовательности ДНК** **элонгация ДНК** **ДНК-полимеразы** **сиквенирование ДНК по Максамому-Гилберту** **препарат меченой ДНК** **набор меченых фрагментов** **«чтение» нуклеотидной последовательности ДНК**

3. Примеры решения задач

3.1. Образцы человеческой ДНК обработанные рестриктазами были проанализированы методом фингерпринта с использованием радиктивно меченого зонда комплементарного к звеньям минисателлитной ДНК. Схематическое изображение радиограммы проведённого фингерпринта ДНК представлены на рисунке справа.

Исходя из характера спектра укажите у одного или двух человек была взята ДНК для анализа?

Решение:

В каждом спектре образцов ДНК представленных на радиограмме с права насчитывается по 10 фракций. Поскольку только 1 фракция у двух образцов полностью совпадает, в то время, как по 9 фракциям имеются чёткие отличия можно однозначно заключить, что ДНК 1 и ДНК 2 взята для фингерпринта у двух неродственных индивидуумов.

3.2. На рисунке справа представлено изображение радиограммы образцов ДНК трёх человек, проанализированых методом фингерпринта с использованием радиктивно меченого зонда, комплементарного к звеньям минисателлитной ДНК.

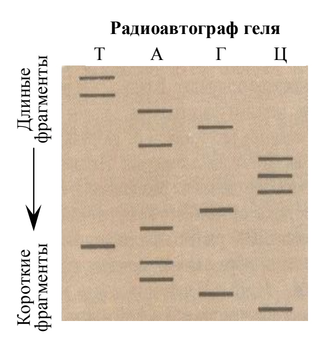
Исходя из характера спектра на радиограмме ДНК полученной в результате фингерпринта укажите возможно ли наличие родственных связей у проанализированных трёх человек?

Решение:

Родственные связи возможны только между исследованными индивидуумами №1 и №2, поскольку из первых 15 фракций ДНК у них совпадает 5. В тоже время индивидуум №3 не может иметь с двумя первыми никаких родственных связей, т. к. из 17 первых фракций у него с ними не совпадает ни одной ни по интенсивности, ни по электрофоретической подвижности.

3.3. Нуклеотидная последовательность короткого рестрикционного фрагмента ДНК длинной в 15 нуклеотидов была сиквенирована методом Максама-Гилберта.

На основе спектра представленного на радиограмме справа определите (прочитайте) нуклеотидную последовательность фрагмента ДНК.



Решение:

Суть метода прочтения (определения) нуклеотидной последовательности по результатам электрофореза на радиоавтографе геля заключается в следующем. Чтение нуклеотидной цепочки начинается с радиоактивно меченого конца. Чем короче радиоактивный фрагмент на геле, тем ближе искомый нуклеотид расположен к началу цепочки. Поэтому самый короткий радиоактивный фрагмент и соответственно первый нуклеотид располагаются в самой нижней части геля. На нашей радиограмме это нуклеотид Ц, второй Г, третий и четвёртый А, пятый Т, шестой А и т.д. вверх по радиоавтографу геля.

Таким образом нуклеотидная последовательность короткого рестрикционного фрагмента ДНК из 15 нуклеотидов по результатам сиквенирования представленного на данной радиограмме следующая: ЦГААТАГЦЦЦАГАТТ.

3.4. Используя для анализа электрофоретический спектр, представленный на радиограмме рис. 2 определите коэффициент специфичности нуклеотидного состава для ДНК человека по результатам сиквенирования 20 нуклеотидов в данном рестрикционном фрагменте ДНК.

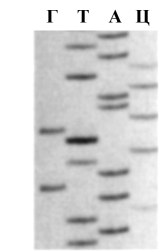


Рис. 2. Схема радиограммы сиквенса ДНК человека

Решение:

Первый нуклетид в данном фрагменте будет Т, второй А, третий Т, четвертый Ц и т.д. вверх по радиоавтографу геля.

В целом нуклеотидная последовательность рестрикционного фрагмента ДНК из 20 нуклеотидов по результатам сиквенирования представленного на радиограмме (рис. 2) следующая: ТАТЦАГАТЦТГЦААЦ-ТЦАТА. Соотношение нуклеотидных пар Г+Ц к А+Т, составляющих коэффициент специфичности для данного фрагмента ДНК человека будет 7/13 или 0.53.

4. Задачи для самоконтроля

ДНК 1 ДНК 2

4.1. На рисунке справа представлено схематическое изображение радиограммы образцов человеческой ДНК, проанализированных методом фингерпринта с использованием радиктивно меченого зонда комплементарного к звеньям минисателлитной ДНК.

Исходя из характера спектра укажите у одного или двух человек была взята ДНК для анализа?

4.2. Если образцы человеческой ДНК представленные на радиограмме в предыдущей задаче были взяты у двух человек, то в какой степени родства по отношению друг к другу они находятся?

4.3. Образцы ДНК, взятые у матери, её ребёнка и двух мужчин, претендующих на то, что они являются отцами были проанализированы методом фингерпринта минисателлитной ДНК. Радиограмма полученных спектров ДНК четырёх человек представлена на рис.3.

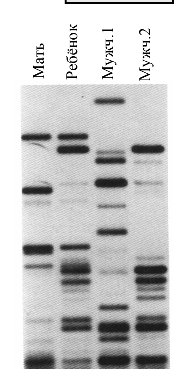


Рис. 3. ДНК фингерпринт матери, ребёнка и двух мужчин.

Проанализируйте представленные спектры ДНК после фингерпринта и укажите, кто из двух мужчин является биологическим отцом данного ребёнка?

4.4. На месте преступления кроме образцов биологических тканей жертвы были обнаружены образцы волосяных фолликул предполагаемого преступника. Спектры ДНК жертвы и предполагаемого преступника, полученные в результате фингерпринта минисателлитной ДНК представлены на радиограмме, приведенной на рис. 4, на дорожках №1 и №2 соответственно. Был проведен также анализ образцов ДНК трех человек, подозреваемых в совершении данного преступления. Спектры их ДНК расположены на дорожках №№ 3-5.

Исходя из представленных спектров ДНК после фингерпринта укажите, кто из трех подозреваемых является предполагаемым преступником?

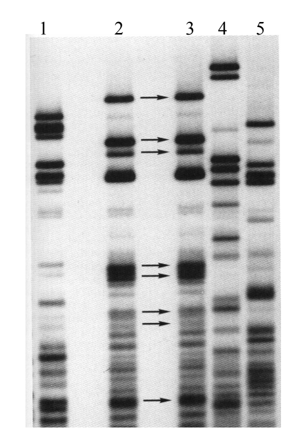


Рис. 4. Фингерпринт ДНК жертвы, предпологаемого преступника и трех

4.5. В ходе расследования убийства на месте преступления была обнаружена капля крови принадлежащая убийце. Спектры ДНК данной капли крови, а также семи подозреваемых, полученные в результате фингерпринта минисателлитной ДНК представлены на радиограмме, приведенной на рис. 5. Спектр ДНК образцов капли крови, оставленный преступником на радиограмме отмечен звёздочкой, а спектры семи подозреваемых - цифрами.

Исходя из представленных спектров ДНК образцов крови на радиограмме после фингерпринта, укажите, кто из семи подозреваемых является предполагаемым преступником?

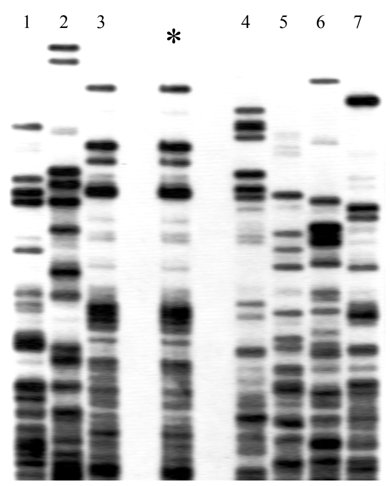
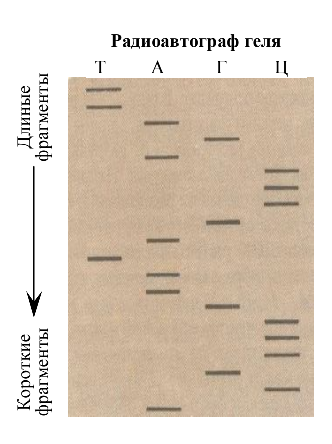


Рис. 5. Фингерпринт спектров минисателлитной ДНК образца капли крови убийцы и семи подозреваемых в преступлении.

4.6. В ходе молекулярно-генетических экспериментов возникла необходимость установить нуклеотидную последовательность

короткого рестрикционного фрагмента ДНК мыши длиной в 20 нуклеотидных пар. Этот фрагмент был сиквенирован методом Максама-Гилберта.



Схематическое изображение радиоавтографа геля, полученного в результате сиквенирования короткого фрагмента ДНК мыши по Максаму-Гилберту представлено на рисунке справа.

Исходя из характера электрофоретического спектра представленного на радиограмме справа определите точную нуклеотидную последовательность рестрикционного фрагмента ДНК мыши длиной в 20 нуклеотидных пар?

4.7. Учёные получили интересный рестрикционный фрагмент ДНК длиной более 60 нуклеотидных пар из генома плодовой мушки *Drosophila melanogaster*. На рис. 6 приведено схематическое изображение радиоавтографа полиакриламидного геля, полученного в результате сиквенирования по Максаму-Гилберту рестрикционного фрагмента ДНК дрозофилы длиной более 60 нуклеотидных пар.

Используя для анализа электрофоретический спектр представленный на схеме радиограммы (рис. 6) определите точную нуклеотидную последовательность первых 20 нуклеотидов в рестрикционном фрагменте ДНК дрозофилы.

4.8. По электрофоретическому спектру представленному на радиограмме рис. 6, который был полученному методом Максама-Гилберта определите точную нуклеотидную последовательность первых 40 нуклеотидов в рестрикционном фрагменте ДНК дрозофилы.

4.9. Используя для анализа электрофоретический спектр, представленный на радиограмме рис. 6 определите коэффициент специфичности нуклеотидного состава для ДНК дрозофилы по результатам анализа первых 50 нуклеотидов в данном рестрикционном фрагменте ДНК.



Рис. 6. Схема радиограммы сиквенса ДНК дрозофилы

4.10. Была установлена нуклеотидная последовательность короткого фрагмента ДНК дрозофилы состоящий из 30 нуклеотидов. Эта последовательность имела следующий состав: ТЦАЦТГЦЦЦГЦТТТЦЦАГТЦГГГ-АААЦЦТГ.

Как будет выглядеть схема радиограммы сиквенса ДНК для этих 30 нуклеотидов?

4.11. Просеквенированный фрагмент ДНК имеет следующую нуклеотидную последовательность: ГЦЦАГЦТГЦАТТААТГААТЦГГЦЦААЦГЦГ.

Изобразите схему радиограммы сиквенса ДНК для этих нуклеотидов?

4.12. На рис. 7 приведена радиоавтография полиакриламидного геля, полученного в результате секвенирования по Сэнгеру фрагмента ДНК человека длиной 50 нуклеотидных пар.

Используя для анализа электрофоретический спектр представленный на радиограмме (рис. 7) определите точную нуклеотидную последовательность первых 20 нуклеотидов во фрагменте ДНК человека.



Рис. 7. Схема радиограммы сиквенса ДНК человека

4.13. Исходя из электрофоретического спектра ДНК представленного на радиограмме рис. 7 определите нуклеотидную последовательность 30 последних нуклеотидов.

4.14. Вычислите коэффициент специфичности для фрагмента ДНК человека на основе результатов секвенирования по Сэнгеру, которые представлены на радиограмме (рис. 7).

5. Задачи повышенной сложности

5.1. Известно, что митохондриальная ДНК передаётся потомкам только с яйцеклеткой, т. е. наследуется по материнской линии. Анализ нуклеотидной последовательности митохондриальной ДНК позволил установить истину в одной почти детективной истории. Долгие годы многие верили, что некая Анна Мэнехен является Анастасией, спасшейся от смерти дочерью



Рис. 8. Семья последнего российского императора Николая II. Царица Александра Фёдоровна вверху справа, Анастасия и Алексей сидят обнявшись.

русского царя Николая II и его жены Александры (рис. 8). Другие же считали Анну Мэнехен самозванкой. Однако однозначных объективных доказательств своей правоты ни та, ни другая сторона предоставить не могли.

	Фрагмент митохондриальной ДНК					
Анна Мэнехен	Ц	Ц	Т	Т	Ц	Т
Карл Маучер (племянник Мэнехен)	Ц	Ц	Т	Т	Ц	Т
герцог Эдинбургский (племянник Александры)	Т	Т	Ц	Ц	Т	Ц

Ниже приведён фрагмент нуклеотидной последовательности митохондриальной ДНК Анны Мэнехен, её племянника Карла Маучера, а также герцога Эдинбургского, который является племянником последней русской царицы Александры – матери Анастасии.

Исходя из приведённых нуклеотидных последовательностей коротких фрагментов митохондриальной ДНК укажите могла ли Анна Мэнехен являться принцессой Анастасией.

5.2. Считается, что наследственное заболевание гемофилия, вызывающее несвёртываемость крови и широко распространённое в 19 веке в королевских семьях Европы первоначально возникло в результате мутации у английской королевы Виктории, которая была гетерозиготным носителем этой болезни. Именно эту мутацию по гену гемофилии через свою мать царицу Александру унаследовал и младший сын царевич Алексей. Существует большая вероятность того, что принцесса Анастасия, сестра Алексея, могла быть также носительницей гена гемофилии.

Можно ли опираясь на приведенные сведения, а также используя данные задачи 5.1 установить последовательность 6 нуклеотидного фрагмента мтДНК у английской королевы Виктории, супруги последнего русского царя Александры и их детей Анастасии и Алексея?

5.3. Ещё в 1949 г. Лайнус Полинг установил, что наследственное заболевание крови – серповидно-клеточная анемия вызывается мутацией, которая изменяет в гене только 1 нуклеотид в результате чего нарушается функция важнейшего белка - гемоглобина. На рисунке справа представлено схематическое изображение результатов секвенирования короткого начального фрагмента ДНК нормального и мутантного глобинового гена.

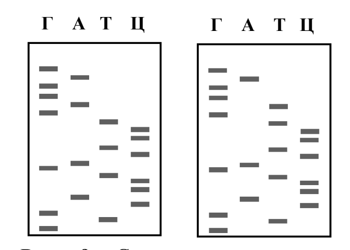


Рис. 9. Схематическое изображение сиквенса короткого фрагмента ДНК нормального (слева) и мутантного (справа) глобинового гена.

Используя результаты сиквенса найдите мутацию в глобиновом гене

приводящую к серповидно-клеточной анемии.

5.4. Каков механизм действия серповидно-клеточной мутации по β-глобино-вому гену? При этом необходимо схематически отразить все этапы реализации генетической информации в нормальном и мутантном сайте от гена до фенотипического признака.

6. Литература

61. **Айала Ф., Кайгер Дж.** Современная генетика: Пер. с англ.: В 3 т. - М.: Мир, 1988. , ил.
62. **Жимулев И.Ф**. Общая и молекулярная генетика: Учеб. пособие. – Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та: Сиб. унив. изд-во, 2002. – 459 с., ил.
63. **Картель Н.А**. Биоинженерия: методы и возможности.- Мн.: Ураджай, 1989.- 143 с., ил.
64. **Методы молекулярной генетики и генной инженерии**/ Мазин А.В. и др. – Новосибирск: Наука. 1990. – 248 с.
65. **Песецкая Л.Н., Гончаренко Г.Г.** Сборник задач по генетике. Гомель: ГГУ, 2002. – 114с.
66. **Рыбчин В.Н.** Основы генетической инженерии: Учеб. пособие для вузов.- Мн.: Выш. шк., 1986.- 186 с.: ил.
67. **Уотсон Дж., Туз Дж., Курц Д.** Рекомбинантные ДНК. Краткий курс: Пер. с англ.- М.: Мир, 1986.- 288 с., ил.
68. **Щелкунов С.Н.** Конструирование гибридных молекул ДНК.- Новосибирск: Наука, 1987.- 168 с.
69. **Льюин Б.** Гены: - Пер. с англ.- М.: Мир, 1987.- 544 с., ил.
70. **Modern genetic analysis/** Griffiths et al. – Freeman and company. New York. 1999. – 675 p.
71. **Principles of genetics.** Snustad P., Simmons M. / Second edition – John Wiley & Sons. New York. 1999. – 876 p.
72. **An introduction to genetic analysis.** Griffiths et al. – Freeman and company. New York. 2000. – 730 p.

ЗАНЯТИЕ 7

ТЕМА: амплификация фрагментов ДНК с помощью метода ПЦР (полимеразной цепной реакции)

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Ознакомиться с методом амплификации (размножения) ДНК с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) на примере решения типовых задач

1. Теоретическая часть

Несмотря на то, что методы исследования наследственного материала (нуклеиновых кислот) все время совершенствовались, тем не менее для анализа структуры ДНК требовалось определенное количество клеточного материала. Например, даже при использовании такого чувствительного метода, как **фингерпринт,** требуется наличие капли крови или другого эквивалентного количества образца животной или растительной ткани, содержащих в клетках достаточное для анализа количество копий ДНК.

Ситуация радикально изменилась благодаря появлению метода, который был разработан Карлом Мюллисом. Этот метод получил название **полимеразной цепной реакции (ПЦР)** и стал неотъемлемой процедурой, освоенной во всех генно-инженерных лабораториях мира. Использование ПЦР методики позволяет **амплифицировать (размножать)** ДНК или её фрагмент in vitro увеличивая количество копий **в миллионы раз за несколько часов**. ПЦР осуществляют в пробирке с помощью специального термостабильного фермента ДНК-полимераза **(Tag-полимеразы)**, набора всех четырех нуклеотидов А, Т, Г и Ц и коротких **олигонуклеотидных затравок** – праймеров. **Праймеры** – это короткие, длиной в **20-30 нуклеотидов**, одноцепочечные фрагменты ДНК, комплементарные **3'-концевым последовательностям** копируемой **ДНК-матрицы**. Благодаря праймерам ограничивается фрагмент ДНК, который будет скопирован Tag-ДНК-полимеразой, присоединяющейся к **3'-концам праймеров** и достраивающие их до заданной длины. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) протекает в три стадии (рис. 1).

1. ***Денатурация***. Инкубационную смесь, в которой содержится образец нужной ДНК, нагревают до температуры 90 °С. При этом, в течении 15 секунд происходит разрушение слабых водородных связей между нитями ДНК, и из одной двухцепочечной молекулы образуется две одноцепочечные.

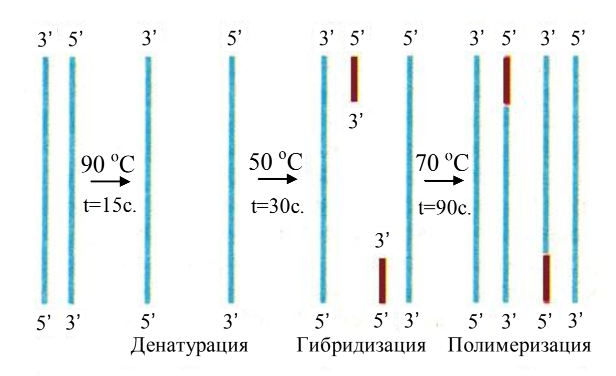


Рис. 1. Последовательные стадии одного цикла амплификации (размножения) фрагмента ДНК с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР).

2. ***Гибридизация праймеров***. Температуру снижают до 50 °С. При этом происходит гибридизация цепей ДНК с праймерами. Эта стадия обычно протекает 30 секунд.

3. ***Полимеризация***. Инкубационную смесь нагревают до температуры 70°С. При этой температуре Tag-полимераза удлиняет оба праймера с их 3'-концов. Праймеры дорастают до размеров матрицы. Этот процесс протекает в течении 90 скунд. В результате **количество ДНК удваивается**. Фермент Tag-полимераза была выделена из термофильных бактерий *Thermus aquaticus,* и отличается устойчивостью к высокой температуре. При температуре 70°С гибрид праймер-ДНК не денатурирует, а Tag-полимераза способна работать с большой скоростью. За 20 циклов амплификации количество копий ДНК достигает величины 10^6.

В последние годы удалось создать специальный прибор -- **амплификатор**, с помощью которого все три стадии размножения ДНК производятся автоматически, что превратило процесс **ПЦР-амплификации** конкретной последовательности ДНК в простую задачу.

За разработку метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) в 1993 г. Карл Мюллис (K. Mullis) был удостоен звания лауреата Нобелевской премии.

ПЦР технологии позволили ученым без огромных временных и материальных затрат получать точные данные по структуре генов и фрагментов ДНК при наличии самого минимального количества биологического материала. Одним из важнейших применений ПЦР стала **диагностика наследственных заболеваний** человека, особенно на **пренатальных стадиях развития** при наличии малого количества ДНК

из **фетальных клеток**. Вторым, не менее важным применением ПЦР технологий стала **дактилоскопия и идентификация индивидуумов**, используя материал ДНК, полученный из нескольких сперматозоидов, одного волоса и, в некоторых случаях, даже из одного **бластомера**, выделенного из **бластоцисты** на стадии восьми зародышевых клеток.

2. Ключевые слова и понятия

фингерпринт **полимеразная цепная реакция** **ПЦР** **амплификация** **праймеры** **20-30 нуклеотидов** **Tag-полимераза** **олигонуклеотидные затравки** **ДНК-матрица** **3'-концы праймеров** **денатурация ДНК** **гибридизация праймеров** **полимеризация**	**количество ДНК удваивается** ***Thermus aquaticus*** **амплификатор** **ПЦР-амплификации** **ПЦР технологии** **диагностика наследственных заболеваний** **пренатальные стадияе развития** **фетальные клетки** **дактилоскопия и идентификация индивидуумов** **бластомеры** **бластоциста**

3. Примеры решения задач

3.1. Для идентификации членов семьи, захороненных в начале XX в., из костных останков ученым удалось получить лишь около 10 копий небольших фрагментов ДНК, содержащих нужный ген. Такое ограниченное количество копий ДНК не позволяет провести секвенирование и электрофоретический анализ гена, что исключает генетическую идентификацию и дактилоскопию членов семьи.

Каково будет количество копий ДНК нужного гена, если исследователю удастся провести 20 успешных циклов амплификации (размножения) фрагментов ДНК из костных останков, используя метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)?

Решение:

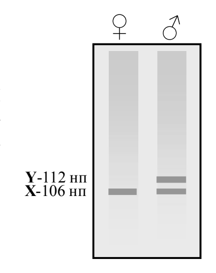
Если исследователю удастся провести 20 успешных циклов амплификации (размножения) фрагментов ДНК из костных останков членов семьи, захороненных в начале XX в., используя метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), то количество копий ДНК нужного гена составит $10x2^{20}$=10485760. Иными словами, за 20 успешных циклов будет получено более 10 миллионов копий ДНК, содержащих нужный ген. Такого количества копий ДНК будет достаточно для любого молекулярно-генетического анализа, включая фингерпринт и секвенирование.

3.2. У человека ген кодирующий компонент зубной эмали – амелогенин расположен в половых хромосомах Х и У. Причем длина этого гена в Х хромосоме состовляет 106 нуклеотидных пар, тогда как в У хромосоме он на 6 пар длиннее.

Как будут выглядеть электрофоретические спектры образцов ДНК, гена амелогенина взятых из костных останков мужчины и женщины и амплифицированных (размноженных) методом ПЦР, после электрофореза в агарозном геле?

Решение:

Образцы ДНК, гена амелогенина взятые из костных останков мужчины и женщины и амплифицированные (размноженные) методом ПЦР на электрофореграмме после электрофореза в агарозном геле будут представлены отличаюшимися спектрами. Схематическое изображение электрофореграммы образцов ДНК мужчины и женщины показано на рисунке справа. Поскольку мужской ген амелогенина расположенный в Y хромосоме был размером на 6 нуклеотидных пар тяжелее, то естественно, на финаграмме его фракция будет двигаться медленнее и располагаться ближе к старту. В целом мужской спектр состоит из двух фракций, одна длиной 112 н.п. образованная геном амелогенина Y хромосомы и одна 106 н.п. образованная геном X хромосомы. У женщин имеются 2 X хромосомы, которые производят лишь один фрагмент величиной 106 нуклеотидных пар.



3.3. Во время пожара в помещении погибло 3 молодых человека. Родительская пара хотела бы точно знать, нет ли среди погибших их сына, который накануне не вернулся домой. При молекулярно-генетической дактилоскопии останков 3 погибших генетики выделили ДНК из костей и после ПЦР-амплификации, используя метод фингерпринта ДНК, проанализировали гены А и Б, которые содержат тандемно повторяющиеся последовательности вариабельной длины. Они так же проанализировали эти два гена у родительской пары. Результаты анализа представлены в таблице справа, где число показывает количество копий тандемного повтора в каждом аллели. Например, у погибшего №3 имеется один аллель с 8, а другой аллель с 9 копиями тандемных повторов в гене А.

Образцы	Ген А	Ген Б
юноша №1	6/8	5/5
юноша №2	7/8	5/7
юноша №3	8/9	7/7
мать	8/8	3/5
отец	7/10	7/7

Исходя из полученных данных, можно ли указать, кто из трех

погибших может быть сыном этой родительской пары?

Решение:

Исходя из полученных данных по молекулярно-генетической дактилоскопии ДНК амплифицированной ПЦР из костей останков 3 юношей и результатов анализа методом фингерпринта ДНК, различных аллелей, содержащих тандемные повторы в генах А и Б у погибших и родительской пары (таблица справа), можно однозначно сказать, что сыном этой пары может быть только юноша №2. Поскольку только у него по гену А имеется аллель 7 полученный от отца и аллель 8 от матери, и по гену Б имеется аллель 5 полученный от матери и аллель 7 от отца. Как следует из данных таблицы генотипы двух других юношей не могли возникнуть от брака этой родительской пары.

3.4. Болезнь Хантингтона, как уже отмечалось в занятии 3, является аутосомно-доминантным заболеванием, при котором происходит нейродегенеративное расстройство, приводящее к летальному исходу. Четкие симптомы этой болезни начинают проявляться только у взрослых как правило после 35 лет.

Семья, в которой один из супругов страдает заболеванием Хантингтона, ждёт ребенка. Они хотели бы уже на эмбриональной стадии на основе молекулярной диагностики определить, болен ли этим заболеванием их будущий ребенок.

Выполнима ли эта задача на современном уровне развития генетики?

Решение:

Да, при современном уровне развития генетики эта задача выполнима. В настоящее время имеется возможность молекулярно-генетической диагностики данного заболевания уже у ребенка любого возраста, включая эмбриональную стадию на основе метода Саузерн-блот анализа. Для этого на первом этапе необходимо изъять несколько эмбриональных клеток из околоплодной амниотической жидкости (рис. 2) и провести амплификацию взятого из этих клеток материала ДНК с использованием метода полимеразной цепной реакции. После того, как будет получено достаточное количество ДНК, необходимо провести Саузерн-блот анализ с использованием специального ДНК-зонда (G8). По полученным электрофоретическим

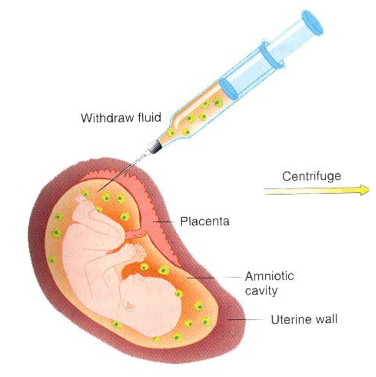


Рис. 2. Процесс изъятия эмбриональных клеток из околоплодной амниотической жидкости (амниоцитез).

спектрам легко установить имеется ли ген заболевания Хантингтона в ДНК их будущего ребенка.

4. Задачи для самоконтроля

4.1. Для генетической идентификации членов семьи, захороненных еще в прошлом веке, генетики из костных останков получили около 20 копий небольших фрагментов ДНК, содержащих нужный ген. Такое ограниченное количество копий ДНК не позволяет провести секвенирование и электрофоретический анализ гена, что исключает генетическую идентификацию и дактилоскопию членов семьи.

Каково будет количество копий ДНК нужного гена, если генетикам удастся провести 10 успешных циклов амплификации (размножения) фрагментов ДНК из костных останков, используя метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)?

4.2. Для генетической идентификации членов семьи египетского фараона XIX династии Сети I, забальзамированных еще в середине II тысячелетия до н. э., молекулярные генетики из костных останков мумий получили около 10 копий небольших фрагментов ДНК, содержащих нужный для дактилоскопии ген. Такое ограниченное количество копий ДНК не позволяет провести секвенирование и электрофоретический анализ гена, что исключает генетическую идентификацию и дактилоскопию членов семьи египетской династии.

Каково будет количество копий ДНК нужного гена, если генетикам удастся провести 20 успешных циклов амплификации (размножения) фрагментов ДНК из костных останков, используя метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)?

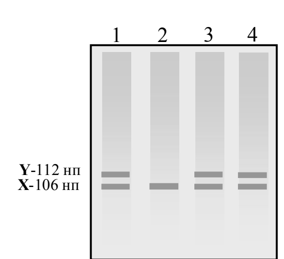
4.3. Можно ли проанализировать фрагмент ДНК, содержащий нужный для дактилоскопии ген имея в наличии лишь два сперматозоида?

4.4. В ходе расследования убийства на месте преступления была обнаружен лишь один волос, принадлежащий вероятному убийце.

Можно ли провести молекулярно генетический анализ фрагмента ДНК, содержащего нужный для дактилоскопии ген (включая фингерпринт и секвенирование) имея в наличии лишь один человеческий волос?

4.5. У человека ген кодирующий компонент зубной эмали – амелогенин расположен в половых хромосомах Х и У. Причем длина этого гена в Х хромосоме состовляет 106 нуклеотидных пар, тогда как в У хромосоме он на 6 пар длиннее.

Как будет выглядеть электрофоретические спектры образцов ДНК, гена амелогенина взятых из костных останков



мужчины и женщины и амплифицированных (размноженных) методом ПЦР, после электрофореза в агарозном геле?

4.6. На электрофореграмме полученной после электрофореза в агарозном геле (рисунок справа) представлены спектры образцов, амплифицированных методом полимеразной цепной реакции ДНК гена амелогенина, взятые из костных останков захоронения четырех представителей одной знатной семьи.

Исходя из представленного электрофоретического спектра четырех образцов, можно ли точно определить, сколько мужчин и сколько женщин находились в захоронении?

4.7. В ходе идентификации останков девяти представителей царской семьи Николая II, расстрелянной в 1918г., был проведен электрофоретиче-

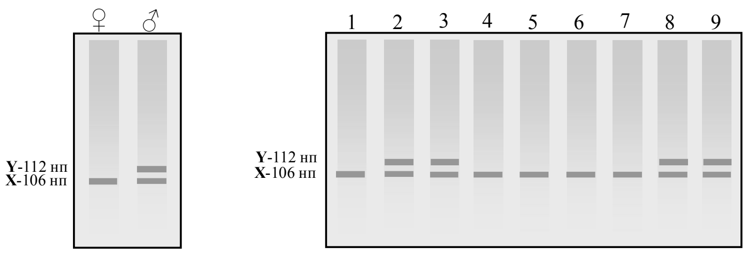


Рис. 3. Электрофореграмма образцов ДНК гена амелогенина из костных останков 9 представителей царской семьи Николая II (слева в качестве контроля спректры ДНК гена амелогенина из живых тканей мужчины и женщины).

ский анализ образцов ДНК гена амелогенина из костных останков, амплифицированных методом полимеразной цепной реакции. Полученная электрофореграмма образцов ДНК приведена на рис. 3. Слева в качестве контроля приведены спректры ДНК гена амелогенина синтезированных на матрице геномной ДНК из живых тканей мужчины и женщины.

Исходя из представленных 9 спектров, останков семьи Николая II определите, сколько женщин находилось в захоронении?

4.8. В калифорнийском лесу было найдено 4 обгоревших трупа. Возникло подозрение, что это может быть двое детей и родители пропавшей семьи Джонсонов. При молекулярно-генетической дактилоскопии останков 4 погибших генетики выделили ДНК из костей и после ПЦР-амплификации используя метод фингерпринта ДНК проанализировали гены А и Б, которые содержат тандемно повторяющиеся последовательности вариабельной длины. Они так же проанализировали эти два гена еще у живого мужчины, который как подозревали так же

Образцы	**Ген А**	**Ген Б**
ребенок 1	8/8	3/7
ребенок 2	7/8	5/7
женщина	8/8	3/5
мужчина 1	7/10	7/7
мужчина 2	8/9	5/7

мог быть отцом этих детей. Результаты анализа генов А и Б представлены в таблице справа, где число показывает количество копий тандемного повтора в каждом аллеле. Например, у погибшего ребенка 2 имеется один аллель с 7 , а другой аллель с 8 копиями тандемных повторов в гене А.

Исходя из полученных данных можно ли определить, кто из двух мужчин может быть отцом погибших детей?

4.9. Путем искусственного оплодотворения в пробирке была получена зигота, которая после нескольких делений достигла стадии восьми бластомеров.

Можно ли с помощью специального ДНК-ового зонда провести молекулярный анализ генотипа этого эмбриона на наличие у него наследственного заболевания циклический фиброз, если использование одного бластомера не повлияет на дальнейшее развитие эмбриона.

4.10. Болезнь Хантингтона, является аутосомно-доминантным заболеванием, при котором происходит нейродегенеративное расстройство, приводящее к летальному исходу. Четкие симптомы этой болезни начинают проявляться только у взрослых.

В семье, которая ждет ребенка, один из супругов страдает заболеванием Хантингтона. Они хотели бы уже на эмбриональной стадии определить, болен ли этим заболеванием их будущий ребенок. Возможно ли это?

5. Задачи повышенной сложности

5.1. Частота гена, несущего аутосомно-рецессивное наследственное заболевание—циклический фиброз превышает 6% в популяциях Северной Европы. В исландской молодой семье первый ребенок оказался больным циклическим фиброзом. У жены взяли 15 яйцеклеток и успешно оплодотворили спермой мужа. Было получено 15 эмбрионов, достигших стадии развития восьми бластомеров.

Как отобрать эмбрионы, у которых заболевание циклический фиброз будет отсутствовать?

5.2. Исходя из приведенных выше данных по 15 зародышам и генотипам родителей исландской семьи укажите, сколько полученных эмбрионов несут ген заболевания циклическим фиброзом в гомозиготном и гетерозиготном состоянии.

6. Литература

73. **Айала Ф., Кайгер Дж.** Современная генетика: Пер. с англ.: В 3 т. - М.: Мир, 1988. , ил.

74. **Жимулев И.Ф**. Общая и молекулярная генетика: Учеб. пособие. – Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та: Сиб. унив. изд-во, 2002. – 459 с., ил.
75. **Картель Н.А**. Биоинженерия: методы и возможности.- Мн.: Ураджай, 1989.- 143 с., ил.
76. **Методы молекулярной генетики и генной инженерии**/ Мазин А.В. и др. – Новосибирск: Наука. 1990. – 248 с.
77. **Песецкая Л.Н., Гончаренко Г.Г.** Сборник задач по генетике. Гомель: ГГУ, 2002. – 114с.
78. **Рыбчин В.Н.** Основы генетической инженерии: Учеб. пособие для вузов.- Мн.: Выш. шк., 1986.- 186 с.: ил.
79. **Уотсон Дж., Туз Дж., Курц Д.** Рекомбинантные ДНК. Краткий курс: Пер. с англ.- М.: Мир, 1986.- 288 с., ил.
80. **Щелкунов С.Н.** Конструирование гибридных молекул ДНК.- Новосибирск: Наука, 1987.- 168 с.
81. **Льюин Б.** Гены: - Пер. с англ.- М.: Мир, 1987.- 544 с., ил.
82. **Modern genetic analysis/** Griffiths et al. – Freeman and company. New York. 1999. – 675 p.
83. **Principles of genetics.** Snustad P., Simmons M. / Second edition – John Wiley & Sons. New York. 1999. – 876 p.
84. **An introduction to genetic analysis.** Griffiths et al. – Freeman and company. New York. 2000. – 730 p.

Гончаренко Григорий Григорьевич

ОСНОВЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ
инженерии

Методическое пособие

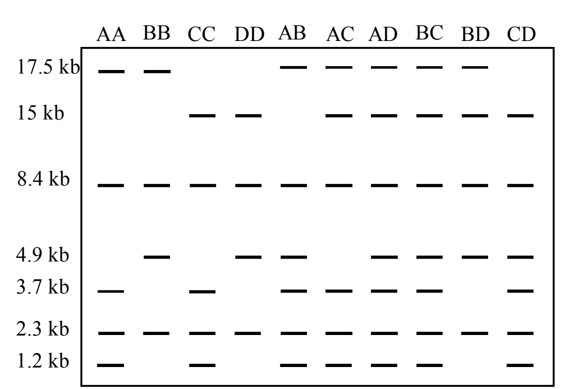


Лицензия ЛВ № 357 от 12.02.99. Подписано в печать 25. 06. 03.
Формат 60×90 $^1/_{16}$. Бумага офсетная. Гарнитура Таймс.
Усл. печ. л. 6,74. Уч.-изд. л. 7,3. Тираж 100 экз. Заказ № 87.
Учреждение образования «Гомельский государственный
университет им. Ф. Скорины »
246699, Гомель, ул. Советская 104.
Отпечатано на ризографе с оригинала-макета автора.
Редакционно-издательский отдел 246699, Гомель, ул. Песина, 80.

ОТВЕТЫ НА ЗАДАЧИ ПОВЫШЕННОЙ СЛОЖНОСТИ

Анализ и использование фрагментов ДНК

1.



Как видно из представленной авторадиограммы, электрофоретические спектры рестрикционных фрагментов ДНК, гибридизующихся с зондом G8, будут одинаковыми только у гетерозигот AD и BC.

2. У проанализированных членов венесуэльской семьи, родословная которых приведена на рисунке 9 (стр. 36) существует прямая связь заболевания Хантингтона с генотипами AC, BC и CC, так как практически все потомки с этими тремя генотипами имели БХ, в то время как все потомки с тремя альтернативными генотипами AA, BB, AB были здоровы.

Что касается конкретного аллеля, то в этой семье существует четкая связь заболевания БХ только с аллелем C.

3. Наличие генотипа AC у здоровой женщины в шестом поколении (VI-5) венесуэльской семьи вероятнее всего объясняется тем, что она является кроссовером между локусом, несущим заболевание, и маркерным локусом, образовавшимся в результате кроссинговера в хромосоме с БХ и аллелем C.

4. Поскольку из 20 потомков в венесуэльской семье, несущих аллель C, 19 страдают болезнью Хантингтона, а один является кроссовером, то величина кроссинговера составит 5% (1/20•100%). Отсюда следует, что

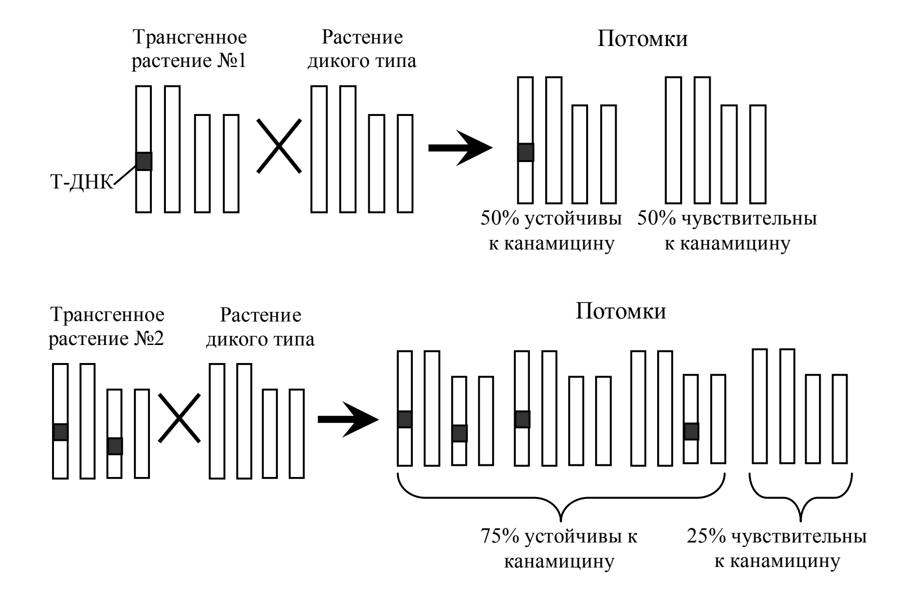
ДНК-маркер по зонду G8 расположен на расстоянии 5 морганид от гена, обуславливающего это заболевание.

5. Зонд G8 может быть использован для идентификации района ДНК, в котором непосредственно расположен сам ген, обуславливающий заболевание Хантингтона, что поможет выделить и проанализировать данный ген.

В дальнейшем выделенный ген, обуславливающий болезнь Хантингтона, может быть успешно клонирован, транскрибирован и транслирован, что в итоге даст возможность идентифицировать конкретный белковый продукт.

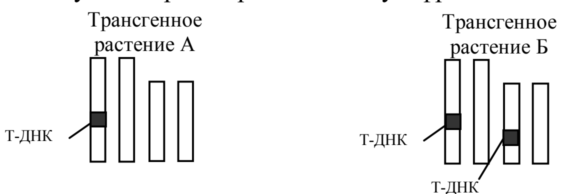
Плазмидные вектора – специальные устройства для доставки и клонирования чужеродных генов

1. В геном трансгенного растения №1 встроился только один фрагмент Т-ДНК с нужным геном. В геноме трансгенного растения №2 встроились два фрагмента Т-ДНК, причем в негомологичные хромосомы.



2. Соотношение потомков от самоопыления, при котором 3/4 из них оказались канамицинустойчивыми, а 1/4 – чувствительными, т. е. 3 : 1,

может быть получено при условии если только один фрагмент Т-ДНК встроен только в одну хромосому растения А, тогда как соотношение 15 : 1 может быть получено при встраивании двух фрагментов Т-ДНК в две



негомологичные хромосомы, что имело место в растении Б. Таким образом хромосомы, трансгенных растений *Arabidopsis thaliana* А и Б будут выглядеть так:

3. Да, можно, поскольку на левом и правом концах полилинкера плазмиды pUC18 имеются сайты рестрикции для рестриктаз Hind III и EcoR I и если плазмиду обработать этими рестриктазами одновременно, то у неё образуются два разных липких конца. При обработке фрагмента человеческой ДНК величиной 0.5 кб, имеющей на концах такие же сайты рестрикции, одновременно двумя рестриктазами Hind III и EcoR I у ней также образуются два разных липких конца совпадающей с таковыми у обработанной плазмиды pUC18. Поэтому процесс лигирования (вставки) данного фрагмента человеческой ДНК в плазмиду pUC18 в стандартных условиях пройдёт успешно.

Фаговые и космидные вектора и создание геномных библиотек

1. Поскольку в незрелых эритроцитах более половины мРНК является глобиновой её легко можно выделить и использовать с помощью обратной транскриптазы для получения соответствующей кДНК. Затем при скрининге геномной библиотеки клонов *E. coli* на нитроцеллюлозном



Идентификация бактериальных колоний, содержащих плазмиду со вставкой фрагмента геномной ДНК с β-глобиновым геном. Бактерии с рекомбинантной плазмидой, содержащей последовательности, гомологичные последовательности меченого кДНК зонда, гибридизуются и выявляются радиоавтографически. Затем на исходной чашке отыскивают колонию, локализованную там же, где и соответствующая колония на фильтре-реплике.

фильтре радиоактивно меченная кДНК, используемая как зонд будет комплиментарно гибридизоваться только с ДНК β-глобинового гена. Поэтому по месторасположению радиактивной метки клон *E. coli,* содержащий фрагмент ДНК с β-глобиновым геном легко найти и выделить из него необходимое количество β-глобиновой ДНК.

2. Полученные четыре фракции на радиоавтограмме говорят о том, что рестриктаза HindIII три раза разрезала ДНК структурного гена белка зеленой мартышки, в то время как кДНК, несущую только экзонную часть она разрезала лишь один раз. Следовательно, в исследованном структурном гене зеленой мартышки, который отвечает за синтез важного белка имеются два сайта рестрикции по HindIII в интронной части гена и только один в экзонной.

Генная дактилоскопия и полный сиквенс (прочтение) нуклеотидных последовательностей ДНК

1. Если бы Анна Мэнехен действительно была принцессой Анастасией, то её мтДНК была такой же, как у всех родственников последней русской царицы Александры, включая её племянника герцога Эдинбургского. И короткий фрагмент проанализированной мтДНК у неё был бы ТТЦЦТЦ. Но фрагмент её мтДНК имеет другой состав и полностью совпадает с мтДНК её истинного племянника Карла Маучера, все предки и родственники которого никогда не имели родственных связей с королевскими семьями Европы, в том числе с семьёй последнего русского царя Николая II.

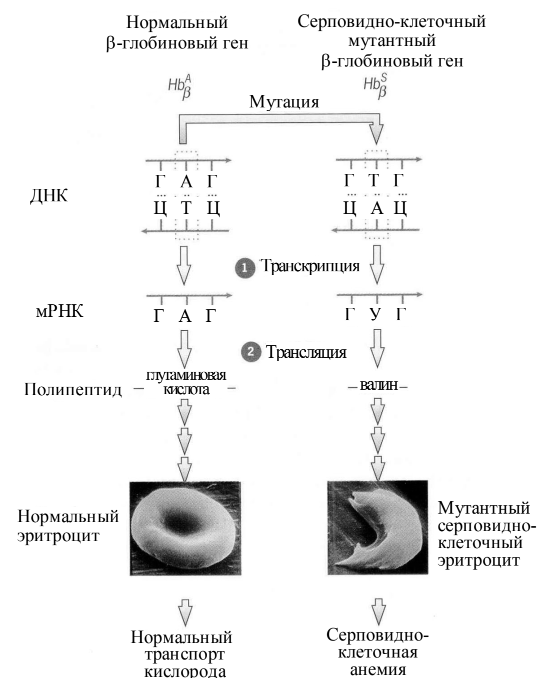
Таким образом можно однозначно утверждать, что Анна Мэнехен не являлась принцессой Анастасией.

2. Да, можно. Так как супруга последнего русского царя Александра и её дети Анастасия и Алексей, а также герцог Эдинбургский являются прямыми потомками королевы Виктории по материнской линии то у всех у них последовательность 6 нуклеотидного фрагмента мтДНК будет следующая ТТЦЦТЦ.

3. Исходя из электрофоретического спектра сиквенированного короткого начального фрагмента ДНК глобинового гена схематически представленного на радиограмме рис. 9 нуклеотидная последовательность для нормального глобинового гена будет: ГТГЦАЦЦТГАЦТЦЦТГАГГАГ, а для мутантного ГТГЦАЦЦТГАЦТЦЦТГ**Т**ГГАГ. Таким образом мутация приводящая к серповидно-клеточной анемии произошла только в одном сайте, при этом нуклеотид А в семнадцатом положении β-глобинового

гена заменился на нуклеотид Т.

4. От мутации, произошедшей только в одном сайте β-глобинового гена заместившего в семнадцатом положении нуклеотид А на Т до фенотипического проявления этой мутации, выражающегося в заболевании серповидно-клеточной анемией происходит ряд сложных этапов.



Основные этапы реализации генетической информации в нормальном и мутантном сайте от гена до фенотипического признака представлены на рисунке справа. Хорошо видно, что мутантный новый триплет ГТГ, возникший после мутации на первом этапе транскрибировался в молекуле мРНК вместо кодона ГАГ в новый кодон ГУГ. В результате этого вместо глютаминовой кислоты в шестом положении после процесса трансляции в состав цепочки β-глобина вошла другая аминокислота - валин. Именно из-за замены одной аминокислоты в составе β-глобинового полипептида при формировании четвертичной структуры гемоглобина возникают дефекты в его функциональной способности переносить кислород. Наличие дефектного гемоглобина придаёт эритроциту характерную серповидно-клеточную форму и приводит к заболеванию получившему название серповидно-клеточная анемия.

ТЕСТЫ ДЛЯ САМОПРОВЕРКИ УСВОЕННОГО МАТЕРИАЛА

1. Основы молекулярной генетики

Тест 1.1

Ниже приведены 5 правильных ответов для 10 первых задач (4.1 – 4.10). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

–. ТТТААГГЦЦЦ.

–. ТТАГЦГАЦТА.

–. А Т Ц А Т А Г Ц Ц Г.

Т А Г Т А Т Ц Г Г Ц.

–. ААГЦУЦАУГГУА.

–. УУУЦУАГУГАУААГАЦААУГАУ.

–. ГУУЦУГУАУАГЦААУГА

Тест 1.2

Ниже приведены 5 правильных ответов для 10 задач (4.11 – 4.20). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

–. Пролин – пролин – пролин – пролин.

–. Лейцин – лейцин – изолейцин – валин – изолейцин – триптофан– лейцин – лейцин.

–. Аланин, аспарагин, цистеин, глицин.

–. Один из вариантов решения: УУУ, УГА, ЦЦА, ЦАА, ГЦА.

–. После удаления из ДНК шестого нуклеотида аминокислоты в молекуле белка имеют следующий порядок: треонин – глутамин – тирозин.

–. Один из вариантов решения: АУУ, ГАУ, ЦАГ, ААА, ГЦА, ГАЦ.

Тест 1.3

Ниже приведены 5 правильных ответов для 9 последних задач (4.21 – 4.29). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

–**.** После вставки тимина белок имеет вид: серин – треонин – лейцин – глицин.

–**.** После воздействия азотистой кислотой цепь белка будет иметь следующее строение: цистеин – глутаминовая кислота – серин – изолейцин – глицин – серин. Это один из вариантов ответа.

–**.** Один из вариантов ответа: ГЦА АЦЦ АТА ГТА ААА

ЦГТ ТГГ ТАТ ЦАТ ТТТ.

–**.** Один из возможных вариантов решения:

ААА ЦАА ЦТА ГТТ ГТА ГАА АЦА ЦЦА ТЦА ГТА

ТТТ ГТГ ГАТ ЦАА ЦАТ ЦТТ ТГТ ГГТ АГТ ЦАТ

–**.** Один из вариантов решения: ГЦА ГГА ГАА ЦАА ГЦГ
ЦГТ ЦЦТ ЦТГ ГТТ ЦГЦ

Тест 1.4

Ниже приведены 5 правильных ответов для 10 первых задач(4.1 – 4.10). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

–**.** АГЦТАААТГЦ .

–**.** АТЦЦГАТТАТЦГ.

–**.** УААЦГАГУУУ.

–**.** ГУГЦУАГГААГА.

–**.** ЦГЦТГТААААГЦГЦАТЦАТЦТТАА.

–**.** АУУЦУГУАУАГЦААУГА

Тест 1.5

Ниже приведены 5 правильных ответов для 10 следующих задач (4.11 – 4.20). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

–**.** Серин – аргинин – фенилаланин – фенилаланин.

–**.** Лейцин – валин – лейцин.

–**.** Один из возможных вариантов ответа: АГА, АУА, АГГ, УАЦ.

–**.** После удаления из гена первого нуклеотида белок имеет вид: аргинин – валин – лейцин.

–. При удалении из молекулы ДНК второго нуклеотида строение белка таково: глицин – фенилаланин – серин.

–. Один из возможных вариантов ответа: АГУ, ГУА, ГГГ, УАЦ.

Тест 1.6

Ниже приведены 4 правильных ответа для 9 последних задач (4.21 – 4.29). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

–. После облучения начало цепочки белка: глицин – треонин – глицин.

–. Один из возможных вариантов решения: АЦУ-УГГ-УАУ-ГУУ.

–. Один из вариантов решения:

и-РНК: ГЦУ – АГА – АЦУ – ААА

ДНК : ЦГА ТЦТ Т ГА ТТТ

ГЦТ АГА АЦТ ААА.

–. Один из возможных вариантов решения:

ЦЦА ТАА ЦАА ГТТ ГТЦ

Г ГТ АТТ ГТТ ЦАА ЦАГ

–. Один из возможных вариантов решения: ГЦУ-УГА-УАУ-ГГУ.

2. Ферменты рестрикции и получение гибридной ДНК

Тест 2.1

Ниже приведены 4 правильных ответа для 8 задач (4.1 – 4.8). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

–. В приведенной ДНК имеется один участок распознавания: ГГАТЦЦ для рестриктазы Bam I (см. таблицу на стр. 18). Поэтому ДНК может быть разрезана в одном месте с образованием двух фрагментов.

–. Рестриктаза EcoR I может разрезать фрагмент **а**.

–. Частота встречаемости четырехнуклеотидного фрагмента ЦЦГГ составит $(1/4)^4 = 1/256$. Таким образом, средняя длина фрагментов ДНК при разрезании Hpa II составит 256 нуклеотидных пар.

–. Средняя длина фрагментов ДНК при разрезании рестриктазами, узнающими восьминуклеотидную последовательность, составит 65536 нуклеотидных пар.

–. Средняя длина фрагментов при разрезании рестриктазами составит 53637 нуклеотидных пар.

Тест 2.2

Ниже приведены 4 правильных ответа для 7 задач (4.9 – 4.15).. Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

–**.** Должно получиться 732422 + 23 =732445 рестрикционных фрагментов.

–**.** 52734 + 1 =52735 фрагментов.

–**.** 24414 + 4.

–**.** Bam I может разрезать фрагменты с образованием липких концов, а ДНК-лигаза скрепит их в одну молекулу.

–**.** 52734 фрагментов.

Тест 2.3

Ниже приведены 4 правильных ответа для 8 задач (4.1 – 4.8).. Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

–**.** ДНК может быть разрезана в одном месте рестриктазой Hae III с образованием двух фрагментов.

–**.** Фрагменты **а** и **б** могут быть разрезаны рестриктазами Hind III и Hpa II соответственно.

–**.** Средняя длина фрагментов ДНК при разрезании EcoRI составит 4096 нуклеотидных пар.

–**.** В результате полного расщепления человеческой ДНК рестриктазой Not I должно получиться 45776 + 23 = 45799 фрагментов.

–**.** Средняя длина фрагментов ДНК при разрезании EcoRI составит 2055 нуклеотидных пар.

Тест 2.4

Ниже приведены 3 правильных ответа для 7 задач (4.9 – 4.15). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

–**.** 3296 + 1 = 3297 фрагментов.

–**.** 18359 рестрикционных фрагментов.

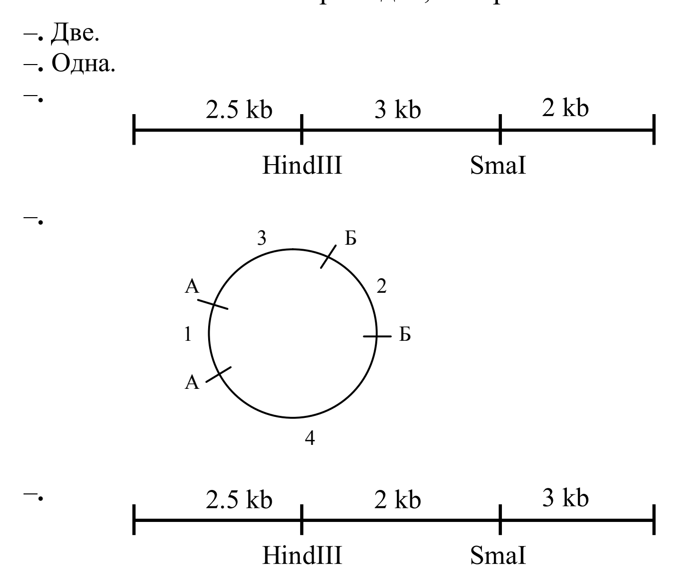
–**.** С помощью Hind III можно разрезать оба фрагмента ДНК с образованием липких концов АГЦТ. Затем при смешении фрагментов липкие концы скрепятся между собой за счет водородных связей, а окончательную сшивку в единую гибридную молекулу произведет ДНК-лигаза.

–**.** 22575 рестрикционных фрагментов.

3. Анализ и использование фрагментов ДНК

Тест 3.1

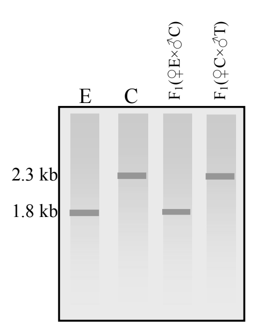
Ниже приведены 4 правильных ответа для задач 4.1 – 4.8. Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.



Тест 3.2

Ниже приведены 4 правильных ответа для задач 4.9 – 4.15. Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

–.



–. Так как оба родителя являются носителями поврежденного гена, т.е. гетерозиготами, то вероятность рождения детей с заболеванием циклический фиброз равна 25%.

–. Младший брат является нормальной гомозиготой, а остальные носителями заболевания.

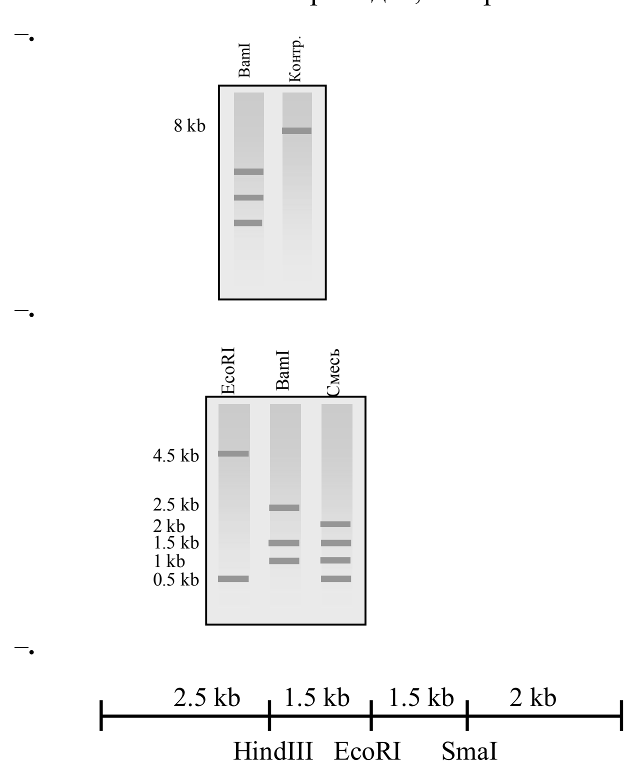
–. Первый ребенок (эмбрион) является гетерозиготой и соответственно унаследует аллель ДНК-маркера (3.7, 1.2 кб), сцепленный с болезнью Хантингтона, а учитывая 4% кроссинговер между геном, определяющим заболевание и сцепленным с ним ДНК-маркером можно сказать, что только в одном случае из 25 он будет нормальной гомозиготой.

Второй ребенок в любом случае унаследует аллель, несущий болезнь Хантингтона, поскольку поврежденный ген он обязательно получит от отца, который является гомозиготой по гену, обуславливающему заболевание.

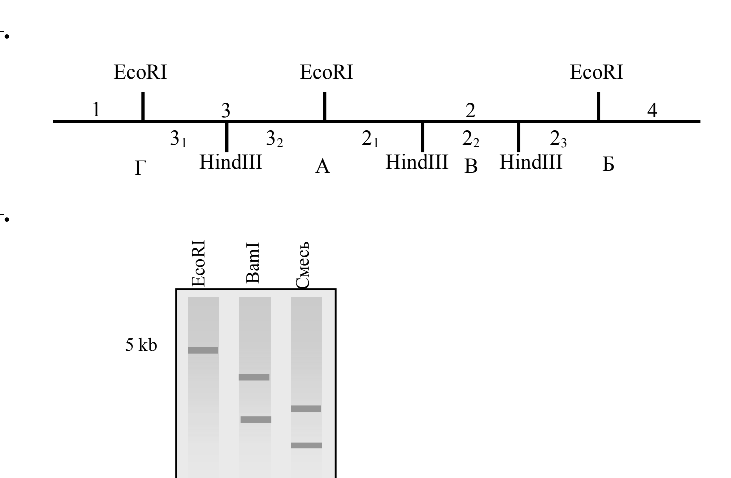
–. Все являются нормальными гомозиготами.

Тест 3.3

Ниже приведены 4 правильных ответа для задач 4.1 – 4 .8. Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.



–.



Тест 3.4

Ниже приведены 3 правильных ответа для задач 4.9 – 4.15. Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

–. Выявить мутацию, приводящую к заболеванию, можно достаточно легко используя молекулярно-генетические методы. Для этого индивидуальные образцы ДНК необходимо обработать рестриктазой EcoRI. Затем, полученные рестрикционные фрагменты подвергнуть электрофоретическому фракционированию в агарозном геле с последующей Саузерн-блот гибридизацией, используя в качестве зонда меченый фрагмент специфической ДНК.

Поскольку в результате мутационной замены нуклеотида в ДНК гена, обуславливающего заболевание, происходит потеря сайта рестрикции для EcoRI, который присутствует в нормальном гене, то на авторадиограмме образцов, взятых у здоровых людей, будут присутствовать две фракции. В тоже время в образцах, взятых у людей, являющихся носителями заболевания циклический фиброз, будет присутствовать дополнительная «тяжелая» (неразрезанная) фракция ДНК.

–. Старший сын является носителем заболевания циклический фиброз.

–. Оба родителя являются носителями заболевания.

–. Все нормальные братья и сестры являются носителями.

4. Плазмидные вектора – специальные устройства для доставки и клонирования чужеродных генов

Тест 4.1

Ниже приведены 4 правильных ответа для 8 задач (4.1 – 4.8). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

–. Нет, поскольку во фрагменте отсутствует сайт для EcoR I.

–. Второй с помощью рестриктазы Hind III.

–. Можно. Первый с использованием EcoR I, второй – Hind III.

–. Так как трансформированные бактерии не растут на среде, содержащей тетрациклин, то можно предположить, что в плазмидной ДНК вставкой поврежден ген устойчивости к этому антибиотику. Следовательно, из плазмиды нужный нам фрагмент можно «вырезать» при помощи рестриктазы Bam I.

–. Первый.

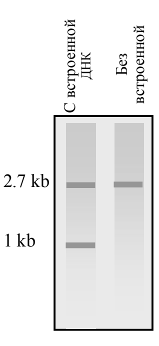
Тест 4.2

Ниже приведены еще 3 правильных ответа для 6 задач (4.9-4.14). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

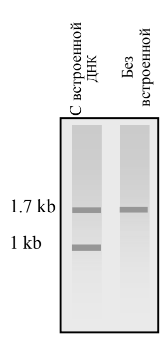
–. Гибридизация меченого зонда произойдет с фракциями ДНК величиной 4 и 2 кб.

–. Гибридизация произойдет с фракциями ДНК величиной 4 и 1 кб.

–.



–.



Тест 4.3

Ниже приведены еще 4 правильных ответа для 8 задач (4.1-4.8). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

–**. а**.

–**.** Оба. Первый при помощи рестриктазы EcoR I, второй при помощи рестриктазы Hind III.

–**.** При помощи фермента Bam I. Бактерии, трансформированные такой плазмидой, не будут расти на средах, содержащих тетрациклин.

–**.** Поскольку белок состоит из 300 аминокислот, то величина гена Ms будет 900 нуклеотидных пар, а тандемная копия составит 900 × 2 = 1800 нп. Следовательно, тандемная копия гена Ms может находиться только во фрагменте 3.

–**.** Только один. При помощи рестриктазы Hae II.

Тест 4.4

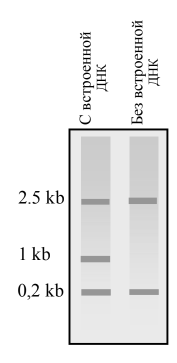
Ниже приведены еще 3 правильных ответа для 6 задач (4.9-4.14). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

–**.** На первом этапе необходимо определить в какое место в плазмиде наиболее оптимально можно встроить ген, нужный нам для последующего клонирования. Фрагмент ДНК грибка *Podospora*, который содержит ген β-тубулина, можно встроить при помощи рестриктазы HaeII. Для этого ДНК грибка и плазмиду нужно обработать рестрикционным ферментом HaeII, произвести гибридизацию линейной молекулы плазмиды и ДНК *Podospora* с последующим сшиванием лигазой. Полученной гибридной плазмидой трансформировать *E. coli*. Далее, трансформированные бактериии выращивать на среде, содержащей

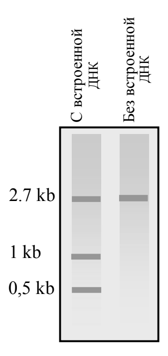
тетрациклин. Затем перенести реплику (отпечаток) колоний на среду, содержащую канамицин. Так как ген устойчивости к канамицину отключен из-за вставки, то бактерии трансформированные гибридными плазмидами, не будут расти на среде, содержащей канамицин. Колонии устойчивые к тетрациклину, но чувствительные к канамицину, и будут искомыми.

–. Удалось. Так как в результате вставки чужеродной ДНК в плазмиду pUC18 произошло нарушение работы гена lac Z, то бактериальные клетки содержащие плазмиды со встроенной ДНК образовали неокрашенные колонии, а не синие.

–.



–.



5. Фаговые и космидные вектора и создание геномных библиотек

Тест 5.1

Ниже приведены 4 правильных ответа для 8 задач (4.1 – 4.8). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

–. Никакой, поскольку величина обеих фрагментов существенно меньше 15 кб.

–. Величина соответствующей β-глобиновой кДНК, составит около 462 нуклеотидных пар.

–. Да удастся в любой плазмиде например pSC101, pBR322 или pUC18 если к данному фрагменту человеческой ДНК подшить с помощью ДНК-лигазы линкерную последовательность допустим ГААТТЦ для действия рестриктазы EcoRI.

–. У линкера для данной кДНК, что бы её можно было клонировать в плазмиде pBR322 по маркёру устойчивости к ампиницилину последовательность должна быть ЦТГЦАГ для действия рестриктазы PstI, расположенной в структуре гена Ap^r.

–. У линкера для данной кДНК, что бы её можно было клонировать в плазмиде pBR322 по маркёру устойчивости к ампиницилину последовательность должна быть ГААТТЦ для действия рестриктазы PstI, расположенной в структуре гена Ap^r.

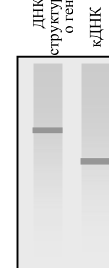
Тест 5.2

Ниже приведены 3 правильных ответа для 6 задач (4.9 – 4.14). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют

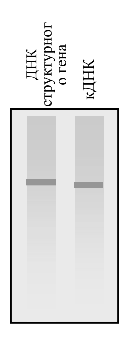
–. Да можно, поскольку EcoRI будет разрезать ДНК дрожжевого грибка на различные фрагменты (величина 4096 н. п. является только средней), в том числе и на фрагменты длиной около 15 кб, которые легко встроятся в фаг λ (λ-вектор) для последующего размножения в *E. coli*

–. Минимальное число различных клонов содержащих отличающиеся фрагменты ДНК человека составляющих геномную библиотеку в данном случае будет 45776 + 23 или 45799.

–. Поскольку структурный ген у высших эукариот всегда существенно длиннее, чем кДНК электрофоретический спектр их образцов после Саузерн-блот гибридизации на радиоавтограмме будет выглядеть следующим образом:



–**.** Электрофоретический спектр ДНК двух образцов после Саузерн-блот гибридизации на радиограмме будет выглядеть следующим образом:



Тест 5.3

Ниже приведены 4 правильных ответа для 8 задач (4.1 – 4.8). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

–**.** Успешно клонировать данный фрагмент ДНК в бактериофаге λ не удастся, т. к. его величина существенно меньше 15 кб.

–**.** Да сумеют, поскольку величина тандемной (двойной) копии данного гена составит около 41 кб и этот фрагмент ДНК можно будет успешно клонировать в космидном векторе.

–**.** Для того чтобы успешно клонировать кДНК гена Pgm дрозофилы в каком либо плазмидном векторе необходимо к кДНК с помощью ДНК-лигазы подшить удобную линкерную последовательность.

–**.** Поскольку рестриктаза EcoRI узнаёт последовательность ДНК, состоящую из шести нуклеотидов то она будет разрезать молекулу двухцепочечной ДНК в среднем один раз на 4096 нуклеотидных пар. И следовательно минимальное число различных клонов содержащих отличающиеся фрагменты ДНК *Saccharomyces cerevisiae,* составляющих геномную библиотеку этого вида будет 3296 + 1 или 3297.

–. Поскольку EcoRI узнаёт последовательность ДНК, состоящую из шести нуклеотидов то она будет разрезать молекулу двухцепочечной ДНК в среднем один раз на 4096 нуклеотидных пар. И следовательно минимальное число различных клонов содержащих отличающиеся фрагменты ДНК *Drosophila melanogaster,* составляющих геномную библиотеку этого вида будет 24414+1 или 24415.

Тест 5.4

Ниже приведены 3 правильных ответа для 6 задач (4.9 – 4.14). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют

–. Минимальное число различных клонов содержащих отличающиеся фрагменты ДНК *Drosophila melanogaster* составляющих геномную библиотеку этого вида будет 24414+4 или 24418.

–. Электрофоретические спектры обеих ДНК на электрофореграммах будут существенно отличаться. ДНК структурного гена у эукариот существенно длиннее поскольку всегда содержит последовательности интронов и другие регуляторные фрагменты ДНК. Поэтому в ходе электрофореза образец ДНК структурного гена будет двигаться медленнее чем кДНК.

–. Нет не могут. Полученные три фракции на радиограмме свидетельствую о том, что сайты рестрикции для EcoRI в данном гене имеются в интронах, но отсутствуют в экзонах. Поэтому рестриктаза EcoRI дважды порезала ДНК структурного гена в интронной части и ни разу в его кДНК (экзонной части).

–. Да могут. Полученные три фракции на радиограмме свидетельствую о том, что сайты рестрикции для EcoRI в данном гене имеются в интронах, но отсутствуют в экзонах. Поэтому рестриктаза EcoRI дважды порезала ДНК структурного гена в интронной части, и ни разу в его кДНК. Всё это говорит о том, что существует три копии данного гена в геноме морской свинки.

6. Генная дактилоскопия и полный сиквенс (прочтение) нуклеотидных последовательностей ДНК

Тест 6.1

Ниже приведены 4 правильных ответа для 8 задач (4.1 – 4.8). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

–. Полное совпадение спектров ДНК в двух образцах говорит о том, что скорее всего они были взяты у одного человека (или у однояйцевых близнецов).

–. Биологическим отцом данного ребёнка может быть только мужчина имеющий спектр ДНК №2.

–. Из семи подозреваемых преступником мог быть только человек обладающий спектром ДНК №3.

–. Нуклеотидная последовательность первых 20 нуклеотидов в рестрикционном фрагменте ДНК дрозофилы будет следующая: ТЦАЦТГЦЦЦ-ГЦТТТЦЦАГТЦ.

–. Нуклеотидная последовательность первых 20 нуклеотидов в рестрикционном фрагменте ДНК дрозофилы будет следующая: ТЦГЦТГЦЦГГ-ЦТАТЦЦАГТЦ.

Тест 6.2

Ниже приведены 3 правильных ответа для 6 задач (4.9 – 4.14). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют

–. Коэффициент специфичности нуклеотидного состава для ДНК дрозофилы по результатам анализа первых 50 нуклеотидов в данном рестрикционном фрагменте ДНК составит 1.27.

–.



–.

Последние 30 нуклеотидов в просиквенированном фрагменте ДНК человека будут иметь следующую последовательность: ТГАТЦГАГАГГГАААТЦААТТЦТГТГААЦГ.

–.



Тест 6.3

Ниже приведены 4 правильных ответа для 8 задач (4.1 – 4.8). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

–. Они могут быть только однояйцевыми близнецами.

–. Предпологаемым преступником может быть только человек имеющий спектр ДНК №3.

–. Нуклеотидная последовательность рестрикционного фрагмента ДНК мыши следующая: АЦГЦЦЦГААТАГЦЦЦАГАТТ

–. Первые 40 нуклеотидов во фрагменте ДНК дрозофилы будут иметь следующую последовательность: ТЦАЦТГЦЦЦГЦТТТЦЦАГТЦГГГАААЦЦТГТЦГТГЦЦАГЦ

–. Первые 40 нуклеотидов во фрагменте ДНК дрозофилы будут иметь следующую последовательность: ТЦАЦТГЦЦГТЦТТТЦЦАГТАЦГГГАААЦЦТГАЦГТГЦААГЦ

Тест 6.4

Ниже приведены 3 правильных ответа для 6 задач (4.9 – 4.14). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют

–.



–. Первые 20 нуклеотидов во фрагменте ДНК человека длиной 50 нуклеотидов будут иметь следующую последовательность: ТАТЦАГАТЦТГЦААЦТЦАТА.

–. Коэффициент специфичности нуклеотидного состава по результатам анализа 50 нуклеотидов в данном рестрикционном фрагменте ДНК человека составит 0,66.

–.

